



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EYACULACIÓN EX COPULA EN
PADRILLOS HOLSTEINER EN ENTRENAMIENTO**

Por

Sofía CAPURRO CORREA
María Isabel OLASO BOZZO

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina
Veterinaria

MODALIDAD: Estudio de Caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobado por:

Presidente de mesa:

Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Nicolás Cazales

Tercer miembro:

Dra. Irene Kalpokas

Fecha:

11/07/16

Autores:

Sofía Capurro Correa

Maríalsabel Oloso Bozzo

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar a nuestras familias por siempre estar ahí alentándonos y apoyándonos a lo largo de toda la carrera.

A nuestros amigos de facultad cuya amistad es para nosotras una bendición. Gracias por todos los momentos que vivimos juntos sin ustedes el recorrido habría sido sin duda mucho más difícil.

Al Dr. Nicolás Cazales por aceptar ser parte de este trabajo, y guiarnos con optimismo y alegría en esta última etapa.

A los funcionarios de biblioteca Rosina, Julia y Alejandra porque siempre alegremente respondieron todas nuestras preguntas ya sea personalmente o por email.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
1. RESÚMEN	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL PADRILLO	12
Escroto.....	12
Epidídimo.....	14
Conducto deferente.....	15
Cordón espermático	15
Ampollas del conducto deferente	16
Glándulas sexuales accesorias.....	16
Glándulas vesiculares	16
Próstata.....	17
Glándulas bulbouretrales	17
Uretra.....	17
Pene.....	18
ESPERMATOGÉNESIS.....	18
FISIOLOGÍA DE LA EYACULACIÓN	20
Emisión.....	21
Expulsión.....	22
MÉTODOS DE COLECTA DE SEMEN.....	23
Vagina artificial.....	23
Preservativo	23
Masturbación.....	24
Colector cervical.....	24

Eyacuación farmacológica.....	24
Electroeyacuación	25
CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EQUINO.....	25
Evaluación seminal	26
Aspecto macroscópico	27
Volumen.....	27
Concentración	28
Motilidad espermática	28
Morfología.....	29
Otros métodos de evaluación.....	29
TRASTORNOS QUE IMPIDEN LA EYACULACIÓN.....	30
Impotencia Generandi	30
Impotencia Coeundi	32
ENFOQUES TERAPÉUTICOS A LOS TRASTORNOS EYACULATORIOS.....	36
Comportamiento y manejo	36
Fármacos.....	36
Agentes adrenérgicos (Xilacina)	37
Antidepresivos tricíclicos (Imipramina)	37
Otras drogas utilizadas.....	38
Prostaglandina	38
Oxitocina.....	39
Ansiolíticos, Analgésicos, GnRH y Testosterona	39
PROTOCOLOS FARMACOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA EYACULACION EX COPULA.....	40
5. OBJETIVOS	42
Objetivo general	42
Objetivos particulares.....	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
Lugar y animales.....	43
Diseño experimental.....	43
Evaluación de semen.....	44
Evaluación de los posibles efectos secundarios	45
8. RESULTADOS.....	45
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIÓN	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Tasa de éxito por número de ensayo.....	44
Tabla 2: Tasa de éxito por padrillo.....	45
Tabla 3: Comparación de los eyaculados obtenidos con vagina artificial e inducción farmacológica.....	45
Tabla 4: Efectos colaterales de los tratamientos en el padrillo N° 1.....	46
Tabla 5: Efectos colaterales de los tratamientos en el padrillo N° 2.....	46

1. RESÚMEN

Este estudio busca probar la eficacia de un método farmacológico ex copula, para inducir la eyaculación en padrillos como tratamiento alternativo en casos de disfunción eyaculatoria o problemas que impidan la eyaculación. Para esto evaluamos la combinación del tratamiento oral con Clorhidrato de Imipramina (3 mg/kg) dos horas antes de la aplicación intravenosa de clorhidrato de xilacina (0,66 mg/kg). Se utilizaron dos padrillos Holsteiner de 6 y 9 años de edad los cuales fueron sometidos a un mismo tratamiento. El tratamiento fue repetido tres veces cada dos días completando tres intentos para cada padrillo. En primera instancia se procedió a la administración de imipramina por vía oral y se dejó al animal suelto en un establo de 4x4 metros cuadrados en un ambiente oscuro y tranquilo. Pasadas las dos horas se lo estimuló sexualmente con una hembra en celo por 10 minutos e inmediatamente se los trató con xilacina intravenosa y se lo observó durante los siguientes 30 minutos. Solo uno de 6 intentos resultó en eyaculación (16,6%). El eyaculado inducido químicamente fue colectado en un guante de tacto colocado sobre el prepucio, el cual fue asegurado a un arnés pendiendo de la región lumbosacra. Luego se colectó un eyaculado a cada padrillo con vagina artificial y se compararon los parámetros con el eyaculado obtenido químicamente. Los parámetros evaluados fueron aspecto, volumen gel, volumen gel-free, concentración, NTE, MT, MP, vigor y morfología. El eyaculado obtenido farmacológicamente fue de menor volumen, menor cantidad de gel, mayor concentración, mayor NTE que los eyaculados obtenidos in copula con vagina artificial. Estas características del eyaculado ex copula sugieren un aumento en la emisión de la fracción rica de espermatozoides y una reducida emisión de fluidos provenientes de las glándulas accesorias, debido al tratamiento utilizado. Como conclusión podemos decir que es factible obtener un eyaculado por inducción farmacológica, que cumpla con las características para su uso en programas de inseminación artificial o congelación de semen.

2. SUMMARY

The aim of this study is to prove the efficiency of a pharmacological method to induce ejaculation in stallions, as an alternative treatment in cases of ejaculatory dysfunctions, or other problems interfering with ejaculation. In this work we evaluated the combination treatment of Clorhydrate of Imipramine (3 mg/kg) administered orally two hours before intravenous application of Clorhydrate of Xylazine (0,66 mg/kg). Two stallions of 6 and 9 years old were used for the same treatment. It was repeated three times every two days to each animal. Imipramine was orally administered leaving the stallion loose in a stable of 4x4 square meter in a quiet environment. After two hours of imipramine administration, we proceeded with the sexual stimulation using a mare in heat. Afterwards the stallion was treated with intravenous xylazine and kept under direct observation during the next 30 minutes. Only one of six attempts resulted in ejaculation (16, 6%). The ejaculate obtained chemically (ex copula) was collected in a rectal palpation glove over the prepuce secured to a harness hanging from the lumbosacral region. Afterwards, we proceeded to the collection with artificial vagina (in copula) in order to compare values with the induced ejaculate. Parameters evaluated were gel volume, gel-free volume, concentration, total sperm number, total motility, progressive motility, velocity and morphology. The ejaculate obtained pharmacologically resulted to be lower in volume and gel, higher concentration and total sperm number than ejaculate obtained in copula with artificial vagina. Characteristics of the ex copula ejaculate suggest an increased emission of spermatozoal rich fraction and a reduction in the emission of fluids from accessory sex glands, as result of the treatment. In conclusion, we can say that the ejaculate obtained by pharmacological induction meets the characteristics for use in artificial insemination programs and semen freezing protocols.

3. INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la historia del Uruguay, el equino ha tenido un rol fundamental; no solo como herramienta de trabajo en el campo y aliado en batallas, entrelazándose de tal modo con nuestra cultura que forma parte del escudo nacional.

En el Uruguay la industria equina permanece en pleno auge de crecimiento y desarrollo. Varios deportes ecuestres han alcanzado importantes reconocimientos permitiendo el acceso de Uruguay al mercado internacional. En la última década se ha constatado un gran avance en la producción equina destacándose por el aumento de productos generados anualmente y ventas tanto en el mercado interno como al exterior (Ferrari, 2012).

Muchas veces nos encontramos en la práctica reproductiva con padrillos de gran valor genético que presentan problemas en el acto copulatorio. La condición músculo- esquelética es crítica para la eficiencia reproductiva de estos reproductores. Existen diversas patologías las cuales provocan discomfort y dolor impidiendo un normal desempeño reproductivo. Entre ellas, dolor a nivel de columna, osteoartritis en miembros (carpo, tarso, nudo), enfermedades neurológicas (disminución de la propiocepción), claudicaciones de miembros posteriores, fracturas de la tercera falange, laminitis, enfermedades musculares, lesiones traumáticas, laceraciones y trombosis aórtico- ilíacas. La meta principal es mantener una adecuada condición física y evitar situaciones o tratamientos que afecten la libido, espermatogénesis o viabilidad espermática. Los trastornos de la libido, la monta y trastornos eyaculatorios, representan la mayoría de las causas de una baja performance reproductiva en padrillos. Siendo las enfermedades músculo- esqueléticas y neurológicas el origen de estos problemas en casi un 50 % de los casos (McDonnell y col, 2003).

Hace 20 años que ciertos laboratorios han venido explorando diversos métodos farmacológicos para mejorar la función eyaculatoria in copula (monta natural o colecta de semen con vagina artificial), así como la inducción farmacológica ex copula (sin esfuerzo copulatorio o estímulo sexual) como método alternativo para la colecta de semen en padrillos.

Los principales compuestos estudiados hasta el momento incluyen las drogas alfa adrenérgicas y otros agentes que promueven las contracciones del músculo liso comúnmente utilizados en la clínica equina. Todos demostraron estimular las contracciones del músculo liso del aparato genital y se han asociado con ocasionales efectos secundarios, como la inducción espontánea de la eyaculación tanto en equinos como en otras especies. Los compuestos estudiados hasta la actualidad, incluyen la xilacina, imipramina, prostaglandina F2alfa, butorfanol y la detomidina. Los protocolos reportados para la inducción de la eyaculación ex copula varían en las dosis, esquema de tiempo, vías de administración, combinación de agentes y procedimientos pre-tratamiento. Los datos reportados hasta el momento, indican tasas de éxito que variaron del 25 al 75% (McDonnell, 2005).

Las características del eyaculado varían significativamente según el tratamiento utilizado, estando relacionado con la capacidad de los distintos agentes de estimular o inhibir las contracciones del músculo liso de las ampollas y glándulas accesorias. El semen obtenido únicamente con xilacina, es similar en cuanto a volumen, concentración, pH y número total de espermatozoides al obtenido in copula mediante vagina artificial. El tratamiento con imipramina y detomidina, aumenta las contracciones de las ampollas del conducto deferente e inhibe la de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de menor volumen, mayor concentración espermática, menor pH y mayor número total de espermatozoides que un eyaculado in copula. Por otro lado, el tratamiento con prostaglandina F2alfa parece aumentar las contracciones de las glándulas accesorias resultando en eyaculados de gran volumen, mucho gel, baja concentración, pH aumentado y número total de espermatozoides similar al obtenido in copula (McDonnell, 1991,

McDonnell y Love 1991, McDonnell y Odian 1994, McDonnell y Oristaglio Turner 1994, Rowley y col, 1999).

El intervalo entre los tratamientos y la eyaculación también varió entre los diferentes protocolos. Solamente con xilacina o con xilacina/imipramina la mayoría de los eyaculados ocurren 1 a 3 minutos post xilacina intravenosa (IV) cuando el animal está entrando en sedación o entre los 15 a 25 minutos luego de la aplicación de la xilacina IV cuando el animal está saliendo de la sedación. Los eyaculados obtenidos solamente con imipramina o con prostaglandina ocurren en un lapso de tiempo de 10 a 50 minutos luego de la administración de los fármacos (McDonnell, 2001).

Los efectos secundarios también varían con el tratamiento, siendo los más notorios cuando se utiliza prostaglandina F₂alfa, observándose, sudoración, contracciones abdominales y goteo de orina. Aparte del leve discomfort generado, el goteo de orina y la sudoración provocan una contaminación no deseada del eyaculado. Con la xilacina y la imipramina el único efecto secundario observado es el grado de sedación y somnolencia del animal junto con una leve sudoración (McDonnell, 2001).

La inducción farmacológica ex copula es recomendada para padrillos con problemas físicos, hormonales, de libido, psicológicos, neurológicos o de comportamiento (McDonnell, 2005; Mrácková y col, 2013). El objetivo de este estudio fue evaluar un régimen de tratamiento similar al propuesto por Johnston y De Luca en 1998, basándonos en un tratamiento oral con imipramina seguido de la administración intravenosa de xilacina para la inducción de la eyaculación ex copula en padrillos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL PADRILLO

Escroto

El escroto es una evaginación de piel compuesta por dos sacos escrotales, uno para cada testículo, separados por el septum escrotal. Está compuesto por cuatro capas, la más externa es la piel, la cual presenta un número muy elevado de glándulas sudoríparas. Debajo de la piel y asociado al tejido conectivo está la túnica Dartos. La túnica Dartos es una capa de fibras musculares lisas entrelazadas con tejido conectivo y es la responsable de controlar la temperatura testicular elevando y descendiendo los testículos (Amann, 2011).

La tercera capa es de tejido conectivo (fascia escrotal); ésta le permite a los testículos un gran movimiento tanto vertical como horizontal dentro del saco escrotal. Normalmente, esta capa previene la rotación de 180° del testículo, aunque en ciertos padrillos puede suceder (Amann, 2011). La capa más interna del escroto es la túnica vaginal parietal, es un saco membranoso que se extiende desde la cavidad abdominal a través del canal inguinal (por aquí también pasa el cordón espermático) hasta el fondo del escroto y la túnica vaginal visceral siendo la capa más externa cubriendo tanto los testículos como el epidídimo (Amann, 2011).

Testículos

Los testículos son las gónadas masculinas y es el sitio donde se producen los espermatozoides y la hormona masculina predominante, la testosterona (Amann, 2011).

Son de forma ovalada, levemente comprimidos a los lados y con su eje mayor casi horizontal. Tienen un tamaño aproximado de 4,5 a 6 cm de ancho, una altura de 5 a 6,5 cm y un largo de 8,5 a 11 cm. Su peso es de 225 grs cada uno aproximadamente, siendo estas medidas dependientes de la edad y raza del padrillo (Blanchard y col, 2003).

El parénquima testicular está compuesto por túbulos seminíferos y tejido intersticial. Los túbulos seminíferos contienen al epitelio seminífero el cual está constituido por dos tipos celulares: las células germinales (espermatogénicas) y las de Sertoli (Amann, 2011).

El túbulo seminífero está limitado por una lámina propia que consiste de fibroblastos, células mioideas (células especializadas de músculo liso) y laminina. Se presume que las contracciones rítmicas de las células mioideas ayudan a transportar los espermatozoides y fluidos de los túbulos seminíferos hacia el epidídimo. Las células germinales son las más numerosas del epitelio seminífero, mientras que las células de Sertoli tienen una doble función coordinando la diferenciación celular y protegiéndolas del sistema inmune del padrillo.

El tejido intersticial incluye vasos sanguíneos, linfáticos, nervios, tejido conectivo y células de Leydig. Las células de Leydig son las responsables de la producción de hormonas esteroideas incluyendo la testosterona y representan el mayor componente de tejido intersticial en padrillos (Amann, 2011).

El túbulo seminífero presenta forma de arco y consiste en tres zonas. La parte contorneada (representa la mayor porción del túbulo, se encuentra altamente

enrollada y es el lugar de producción de los espermatozoides). Se continúa con la porción recta del túbulo seminífero (es el primer pasaje que van a hacer los espermatozoides desde el epitelio seminífero al epidídimo). Los túbulos rectos (van a converger en la rete testis) para finalmente fusionarse con los ductos eferentes para llegar al ducto epididimario. La producción espermática puede estimarse a través de la medición del tamaño testicular. Debido a que su tamaño va a aumentar a partir de los 2 o 3 años de edad para convertirse en un padrillo sexualmente maduro, la producción espermática diaria también se verá aumentada. A mayor tamaño testicular, va a existir una mayor población de células de Sertoli y por lo tanto, una mayor producción espermática (Amann, 2011).

Epidídimo

El epidídimo es un órgano formado en su mayor parte por numerosas circunvoluciones del único ducto epididimario, dentro de una matriz de tejido conectivo. Convencionalmente se divide en tres partes cabeza cuerpo y cola (Dyce, 2007).

La cabeza del epidídimo se encuentra adherida a la cápsula testicular y recibe los ductillos eferentes. El cuerpo y la cola del mismo también se encuentran adheridas al testículo por un ligamento (ligamento propio del testículo) y también a la lámina parietal del saco peritoneal envolvente por el ligamento de la cola del epidídimo. Por último, la cola del epidídimo reduce su volumen y de allí se origina el conducto deferente (Dyce, 2007).

Luego de abandonar los testículos, los espermatozoides ingresan al ducto eferente y son transportados a través de las distintas zonas del epidídimo. La cabeza y cuerpo del epidídimo son zonas de remodelación y maduración espermática y la cola del epidídimo representa el lugar de almacenamiento de los espermatozoides con capacidad de fertilizar (Amann, 2011).

El traslado de los espermatozoides se da a partir de contracciones peristálticas del músculo liso de la pared del conducto y de la cabeza y cuerpo del epidídimo.

Mientras que en la cola el ducto epididimario está inactivo, excepto cuando el músculo liso es estimulado a contraerse (Amann, 2011).

Por lo tanto, el tiempo requerido para el movimiento de los espermatozoides a través de la cabeza y cuerpo no se va a alterar por la frecuencia eyaculatoria y ronda alrededor de los 4 a 5 días. Pero el tiempo de transporte de los espermatozoides a través de la cola del epidídimo sí va a depender de la actividad sexual del padriño. En un padriño sexualmente activo se va a reducir entre 2 a 3 días de los 10 característicos de un padriño en reposo sexual (Amann, 2011).

Conducto deferente

Es la continuación del conducto epididimario y se extiende desde la cola del epidídimo a través del cordón espermático hasta la uretra pélvica. El conducto deferente del padriño tiene una pared extremadamente gruesa de músculo liso, el cual puede ser palpado fácilmente a través de la pared escrotal (Amann, 2011).

Cordón espermático

El cordón espermático se extiende desde el anillo inguinal hasta su unión en el testículo. Es el que suspende el testículo en el escroto y actúa como pasaje para el conducto deferente, nervios y vasos sanguíneos asociados al testículo. El músculo cremáster externo se hace visible sobre el lado lateral del cordón a pesar de no formar parte del mismo. Este músculo estriado actúa como sostén de los testículos y controla la temperatura escrotal. El cordón espermático está constituido por la arteria testicular y las venas que drenan el testículo formando una red alrededor de la arteria. A esta red de venas se le denomina plexo pampiniforme y sirve como un sistema de intercambio de calor que permite termorregular la temperatura testicular (Amann, 2011).

Ampollas del conducto deferente

Cada ampolla se evidencia como un agrandamiento de unos 2 cm de diámetro ubicadas en el segmento terminal del conducto deferente (Schumacher y col, 2011). Las secreciones liberadas a partir de estas estructuras son ricas en ergotamina ayudando a eliminar productos tóxicos causados por el metabolismo espermático (Morel, 2015).

Glándulas sexuales accesorias

Cuando se habla de las glándulas sexuales accesorias del padrillo se hace referencia a las glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales (Schumacher y col, 2011). Éstas, aportan la mayor parte de los fluidos al eyaculado. Los espermatozoides ubicados en la cola del epidídimo y conducto deferente no presentan motilidad hasta ser embebidos por los fluidos de dichas glándulas en el momento de la eyaculación (Amann, 2011).

Estas glándulas actúan de forma colectiva y son las encargadas de producir el plasma seminal (Morel, 2015). El plasma seminal es la fracción de fluido del eyaculado. Sus principales funciones son, el aporte de energía a partir de la glucosa y la protección del espermatozoide de los cambios de presión osmótica mediante el ácido cítrico y el sorbitol como también el aporte de determinadas proteínas que se incorporan a la membrana plasmática de los espermatozoides. La ergotamina es un componente del plasma seminal que lo protege de cambios de pH y de la oxidación (Morel, 2015).

Glándulas vesiculares

Las dos glándulas vesiculares, son estructuras alargadas ubicadas a los laterales de las ampollas. Cada vesícula (con un tamaño normal de 15-20 cm de largo por 5 cm de diámetro) se puede expandir significativamente durante la estimulación sexual debido a los productos de secreción emitidos (Amann, 2011). Son las encargadas

de secretar la mayor parte del plasma seminal con una gran concentración de potasio, ácido cítrico y gel. Esta secreción forma parte tanto de la fracción espermática como de la post-espermática (gel). Su función y el volumen de secreción son dependientes de la concentración de testosterona circulante. Por lo tanto, su contribución al plasma seminal disminuye significativamente durante la estación no reproductiva (Morel, 2015).

Próstata

La glándula prostática es una estructura simple, firme y nodular (Amann, 2011) que consta de dos lóbulos ubicados lateralmente a la uretra pélvica y caudalmente a las glándulas vesiculares (Schumacher y col, 2011). La secreción prostática de los padrillos es alcalina, rica en proteínas, ácido cítrico y zinc, pero el significado de estas propiedades resulta incierto aún (Morel, 2015). La secreción prostática contribuye al fluido del eyaculado (Amann, 2011).

Glándulas bulbouretrales

Estas glándulas pares son las que se encuentran más próximas a la raíz del pene. Su secreción es clara y de aspecto acuoso, contribuyendo principalmente a la fracción pre-espermática, eliminando restos de orina y bacterias de la uretra antes que se produzca la eyaculación. Esta secreción sirve como lubricante facilitando el pasaje del espermatozoide (Morel, 2015).

Uretra

La uretra es una especie de tubo de mucosa secretora que se extiende desde la vejiga hasta el final del pene. La porción pélvica se encuentra recubierta por un grueso músculo estriado denominado músculo uretral, el cual se va a contraer al momento de la eyaculación. Ésta, finaliza en una zona libre llamada proceso uretral. La uretra peneana se encuentra rodeada por el cuerpo cavernoso del pene,

representando un área de tejido eréctil. La uretra actúa como canal excretor de orina y semen (Amann, 2011).

Pene

El pene del padrillo es de tipo músculo- cavernoso y experimenta un considerable aumento de tamaño tanto en longitud como en su diámetro durante la erección. La raíz del pene se encuentra firmemente adherida a la tuberosidad isquiática (Amann, 2011).

El pene es el órgano copulatorio y consta de tres partes: la raíz, la cual se encuentra adherida al sistema esquelético, el cuerpo, siendo la mayor porción del pene y el glande, constituyendo la porción final del órgano. Los componentes primarios del pene son el cuerpo cavernoso y el cuerpo esponjoso que se continúa con la corona del glande; la uretra, el músculo bulboesponjoso junto con las venas y nervios asociados (Amann, 2011).

Cuando el pene se encuentra en reposo mide unos 50 cm de largo y 2- 2,5 cm de diámetro. La erección provoca el aumento de tamaño del pene en un 50%, tanto en longitud como en diámetro, mientras que el glande aumenta en un 300 a 400% (Amann, 2011).

ESPERMATOGÉNESIS

Representa al proceso de división y diferenciación celular por medio del cual son producidos los espermatozoides. Es un largo proceso de 57 días de duración que va a ir incorporando secuencialmente distintos tipos celulares (espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas) (Johnson, 2011). Durante la espermatogénesis, las

espermatogonias sufren determinados cambios hasta llegar a convertirse en espermatozoides. Estos cambios se producen en tres fases diferentes: proliferación, meiosis y espermiogénesis (Bielli, 2002).

El epitelio seminífero, contiene células de dos tipos: las células de Sertoli y las células de la línea germinal, o células espermatogénicas. Las células germinales o madres, son células resistentes que funcionan como fuente de células de la línea germinal y son capaces de repoblar el epitelio seminífero cuando un testículo es sometido a lesiones que destruyen la mayor parte de las células. Si todas las espermatogonias madres de un animal fueran destruídas, la pérdida de la capacidad espermatogénica sería definitiva (Bielli, 2002).

Fase de proliferación (19,4 días): Las espermatogonias, ubicadas en el compartimento basal del túbulo seminífero, sufren una serie de divisiones mitóticas rápidas, hasta que finalmente se transforman en espermatogonias en diferenciación. Éstas últimas son conocidas como espermatogonias A1, A2, A3, y A4, espermatogonias intermedias y espermatogonias B (Bielli, 2002). Las espermatogonias B más diferenciadas se dividen y dan origen a los espermátocitos primarios. A partir de aquí comienza la fase de meiosis.

Fase de meiosis (19,4 días): es una división donde se reduce el material genético. A partir de dos divisiones celulares sucesivas, sin replicación de material genético, las células diploides pasan a ser células redondas haploides (Bielli, 2002).

La tercer y última fase, la espermiogénesis (18,6 días). Es el proceso mediante el cual las espermátidas se convierten en espermatozoides. Ya no hay más multiplicación celular y el número de espermatozoides ahora solo puede variar en caso de muerte de espermátidas. Las espermátidas son más pequeñas que los espermátocitos y se encuentran cerca de la luz del túbulo seminífero. Las espermátidas, según la etapa en que se encuentren dentro del proceso de diferenciación celular, pueden ser llamadas espermátidas redondas, espermátidas alargadas o espermátidas maduras (Bielli, 2002).

El tiempo estimado desde que un espermatozoide es formado hasta que es eyaculado no depende exclusivamente de la actividad sexual del padrillo. Existe un tiempo fijo estimado de 61-62 días (57 días de espermatogénesis más 4-5 días de pasaje a través de la cabeza y cuerpo del epidídimo). Por otro lado, lo que sí depende de la actividad sexual del padrillo es el tiempo de permanencia en la cola del epidídimo que puede variar entre 3 y 10 días). Por lo tanto, lo que demora un espermatozoide desde que se forma hasta ser eyaculado es de aproximadamente 61 a 69 días (Johnson y col, 2011).

FISIOLOGÍA DE LA EYACULACIÓN

Para que se dé la copula en los animales, es necesaria la estimulación sensorial y psicológica. La estimulación sensorial abarca varios componentes: visual, olfativo, auditivo y táctil. La estimulación sensorial del pene junto con la estimulación psíquica, son los desencadenantes fisiológicos para que se lleve a cabo el reflejo de emisión y el reflejo eyaculatorio (McDonnell, 2001). El acto copulatorio culmina normalmente con dos eventos fisiológicos conocidos como emisión y expulsión. La emisión es la liberación de los espermatozoides y fluidos provenientes de las glándulas accesorias hacia la uretra pélvica. La expulsión es la expulsión de los fluidos y espermatozoides hacia el exterior (McDonnell, 1992).

La eyaculación se da en forma de jets (pulsos), es decir, en forma fraccionada, que va desde 5 a 10 jets de semen, cada uno expulsado con menor presión volumen y concentración de espermatozoides que el anterior. Los resultados de un estudio realizado por Kosiniak en 1975 indicaron que existe una reducción aproximada del 50% del volumen inicial en cada jet sucesivo y que más del 70% de los espermatozoides y los constituyentes bioquímicos básicos se encuentran en los primeros tres jets del eyaculado.

Durante la eyaculación, la cola del padrillo se mueve con cada pulso eyaculatorio. El reflejo eyaculatorio es mediado por el nervio pudendo y último segmento sacro de la médula espinal (McDonnell, 1992).

Para que la eyaculación se lleve a cabo, es necesaria una estricta coordinación por parte del sistema nervioso somático y autónomo. Normalmente, la emisión se da primero que la expulsión como resultado de un arco reflejo tóraco-lumbar que va a provocar la contracción del músculo liso de la cola de epidídimo, conducto deferente, ampollas y glándulas accesorias. El mismo arco reflejo va a contraer de manera simultánea el trígono vesical impidiendo la micción de orina y permitiendo la liberación de los fluidos eyaculatorios sobre la uretra pélvica. La expulsión incluye la descarga del fluido seminal hacia afuera del orificio uretral. Los órganos que participan en esta fase son el cuello vesical, la uretra y el músculo estriado pélvico (Turner, 2011).

Como la emisión, la expulsión es un evento predominantemente simpático alfa adrenérgico y es mediado por un reflejo sacro involucrando al nervio pudendo. El reflejo comienza con contracciones rítmicas de los músculos bulbocavernosos, isquiocavernosos y uretrales aumentando la presión intrauretral, haciendo que el semen sea expulsado de forma pulsátil (Turner, 2011).

Emisión

Es la llegada de los espermatozoides y productos de secreción de las glándulas accesorias a la uretra posterior. En este proceso tanto la secreción epitelial como la contracción del músculo liso se dan de manera secuencial. Todos los órganos que participan de la emisión tienen una densa inervación autónoma tanto simpática como parasimpática, la mayoría proveniente del plexo pélvico (Brindley, 1989). Se ha demostrado en humanos que una lesión a nivel de los nervios hipogástricos va a impedir la emisión seminal (Brindley, 1989) así como también, una estimulación eléctrica sobre el plexo hipogástrico superior va a provocar la emisión seminal en hombres parapléjicos (Giuliano y col, 2005).

En el hombre, el estímulo de los receptores sensoriales genitales, principalmente los del glande del pene, se integran a nivel espinal y van a estimular la emisión (Ver Voort, 1987). En esta fase, el control cerebral en humanos también tiene su participación mediante estímulos eróticos y visuales (Giuliano y col, 2005). En el caballo también son importantes la estimulación visual y olfatoria pero a diferencia del hombre, la estimulación del glande no es tan importante como la del cuerpo y la base del pene (Benson y col, 2011).

Expulsión

Representa la eyección de fluidos (semen) desde la uretra hacia el exterior a través del meato del glande del pene. La expulsión es de acuerdo a una idea general aceptada, un reflejo espinal. Durante esta fase, las fibras del músculo liso del cuello de la vejiga se contraen para prevenir el flujo retrógrado del semen hacia la vejiga al mismo tiempo que se produce la relajación del esfínter urinario externo. Los músculos del piso de la pelvis junto con el bulboesponjoso y el isquiocavernoso realizan contracciones rítmicas para propulsar el semen a través de la uretra hacia el exterior. El cuello de la vejiga y parte proximal de la uretra se componen mayormente de fibras musculares lisas, las cuales reciben inervación simpática y parasimpática. El esfínter uretral externo y el músculo del piso de la pelvis están inervados únicamente por el sistema nervioso somático (Giuliano y col, 2005).

Investigaciones realizadas en ratas, indican la posibilidad de la existencia de un gatillo eyaculatorio espinal. Esto nos podría indicar que en el proceso fisiológico eyaculatorio primero se da la emisión y luego una vez activado el reflejo espinal se llega a la expulsión (Giuliano y Clément, 2005). La emisión y la eyaculación pueden ocurrir sin que exista el acto copulatorio de por medio, ya sea de manera espontánea o durante la auto-estimulación. Sin embargo, que sucedan estos procesos de manera espontánea en el equino resultan bastante infrecuentes (McDonnell, 1992).

MÉTODOS DE COLECTA DE SEMEN

La colecta de semen es una técnica habitual en la clínica reproductiva de gran utilidad para la evaluación de la capacidad reproductiva, control de calidad seminal, diagnóstico de fertilidad e inseminación artificial o congelamiento de semen.

El método de elección para la colecta de semen en caballos es la vagina artificial, en algunos casos y por diversos motivos debemos recurrir al uso de otros métodos alternativos que nos permitan obtener y evaluar la producción seminal. A continuación describiremos las alternativas existentes para la colecta de un eyaculado equino.

Vagina artificial

Con este método se obtienen muestras con las mismas características que el de una monta natural. Consiste en una caja externa y un forro interno de látex entre los cuales se infunde agua tibia y/o aire para proveer la presión y temperatura adecuadas (42-45°C). Es la forma más común de obtener un eyaculado. Existen en el mercado una gran variedad de modelos de vaginas artificiales como por ejemplo la Missouri, Botucatú, Nishikawa, Roanoke, Colorado y Hannover entre otras. Para esta técnica se utiliza una yegua en celo o estrogenizada o un maniquí (Serres, 2012).

Preservativo

Este se emplea cuando no se dispone de vagina artificial o el animal no la acepta. Se coloca sobre el pene en erección y debe recuperarse inmediatamente después de la cubrición evitando que caiga al suelo. Debemos tener en cuenta que mediante el preservativo la muestra resultante va a estar muy contaminada con bacterias y detritos del exterior del pene y además el contacto prolongado de los espermatozoides con el látex puede afectar su motilidad. Por estas razones y la incomodidad de su uso es poco utilizado para dicha maniobra (Serres, 2012).

Masturbación

Existen dos formas de realizar esta técnica, manualmente o usando una vagina artificial con el animal en estación. La técnica manual consiste en excitar al padrillo con una yegua en celo, con el pene en erección se colocan compresas atemperadas a 45°C sobre el glande y otra en la base del pene y se masajea hasta que se produce la eyaculación. Con el uso de la vagina artificial se masturba al caballo en estación pudiendo hacer una estimulación manual extra con un paño tibio en la base del pene. Ambas técnicas son prácticas y eficaces una vez que el animal está acostumbrado. Puede ser una técnica peligrosa en algunos casos o con algunos padrillos. Cualquiera de estas técnicas son de elección en caballos con problemas del aparato locomotor que estén imposibilitados o presenten dificultad para realizar el salto. La muestra obtenida es representativa y la contaminación es mínima (Serres, 2012).

Colector cervical

Es útil en padrillos en los cuales la vagina artificial y el preservativo no han tenido éxito. La versatilidad del método permite que se realice en condiciones de campo. Consiste de un recipiente de cristal de borosilicato en el que se aprecian tres partes, la boca, la ampolla y el cuerpo del colector (Serres, 2012).

Eyaculación farmacológica

Consiste en la utilización de fármacos como alternativa a problemas de falta de libido, monta o eyaculación. A pesar de numerosos estudios realizados todavía no son muy claros los mecanismos de acción, ni las vías nerviosas y receptores que la desencadenan (Kelly y col, 1979; Brooks y col (1980); Eppel y col (1984); Booth (1988); McDonnell y col, 1991). De las hipótesis estudiadas, la más aprobada es la eyaculación mediada por receptores alfa adrenérgicos (Serres, 2012). El uso de determinados fármacos y sus combinaciones serán detallados más adelante.

Extracción de espermatozoides de la cola del epidídimo

Para la obtención de los espermatozoides se procede a la disección del epidídimo y colocación de una cánula en el conducto deferente, se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola y se realiza un lavado retrógrado con un diluyente comercial (Serres, 2012).

Electroeyaculación

La electroeyaculación es una técnica utilizada en animales salvajes como la cebra, la alpaca y camellos donde siempre es necesaria la sedación y/o anestesia general. Una de las desventajas que presenta es la variabilidad en la calidad del eyaculado y su frecuente contaminación con orina (Adams, 2009).

CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EQUINO

El análisis del semen nos aporta información respecto a la contribución de cada una de las glándulas al eyaculado. El mismo, contiene glicerilfosforilcolina (GPC), ergotioneína y ácido cítrico. Todos ellos producidos por el epidídimo, ampollas y glándulas vesiculares. La secuencia en la cual los fluidos de estas glándulas son expulsados durante la eyaculación se ha determinado a través del análisis de fracciones seminales obtenidos en intervalos de entre 5 y 10 segundos durante la eyaculación (Amann y col, 2011).

El semen tiene dos componentes principales, los espermatozoides y el plasma seminal. El eyaculado equino está compuesto por diversas fracciones, la primera representa una fracción pre-espermática de apariencia acuosa y sin espermatozoides, con GPC, ergotioneína o ácido cítrico posiblemente secretado por las glándulas bulbouretrales y próstata, cuya eliminación puede ser observada

cuando se realiza el salto o en el período de máxima excitación. Tiene la función de limpiar y lubricar la uretra (Amann y col, 2011).

La fracción rica en espermatozoides contiene 80-90% de espermatozoides y componentes bioquímicos como GPC y ergotioneina pero pobre en ácido cítrico y gel. Esta fracción se forma a partir de secreciones liberadas por el epidídimo (espermatozoides y GPC) y ampollas del conducto deferente. Dicha fracción es eliminada en los primeros 2 a 3 jets de los 6-9 que conforman el eyaculado (Amann y col, 2011).

La fracción pobre o fracción gel producida por las vesículas seminales posee baja concentración de espermatozoides y es rica en ácido cítrico y potasio. Su función es eliminar los espermatozoides restantes que quedaron en la uretra. Su volumen es variable, depende del grado de excitación sexual, la época del año, la edad del reproductor y la frecuencia de extracción del semen. La última fracción, post-coito, es una secreción acuosa de poco volumen (Amann y col, 2011).

Evaluación seminal

Hay muchas razones por las cuales es importante realizar una evaluación seminal:

- Examen pre- compra
 - Antes de comenzar la temporada reproductiva
 - Determinar que un padrillo sea apto como reproductor
- 1.
- Diagnóstico de problemas de fertilidad o de bajos índices de concepción en un establecimiento
 - Para determinar si el semen es adecuado para refrigerar y/o congelar.

Debemos tener en cuenta que aunque tengamos un resultado satisfactorio de la muestra obtenida, no se garantiza el éxito de la fecundación. Esto se debe, a que la habilidad de un espermatozoide para fertilizar un óvulo no solo depende de las características propias del espermatozoide, sino que también de factores

extrínsecos como el plasma seminal, zona pelúcida, medio ambiente oviductal y por supuesto la fertilidad propia de la yegua (Baumber-Skaife, 2011).

Aspecto macroscópico

El color debe ser entre las tonalidades de gris y blanco. Su turbidez nos puede dar una idea de la concentración de espermatozoides.

Es conveniente evaluar la presencia de contaminantes en el semen. Estos pueden ser de origen interno propio del padrillo, como orina, sangre o pus. La urospermia es la presencia de orina en el semen, se aprecia a simple vista un eyaculado de color ámbar amarillento y fuerte olor a orina. El pH del eyaculado se encuentra afectado. La hemospermia, es la presencia de sangre en el eyaculado. Si presenta material purulento, estaríamos frente a una piospermia. Es posible identificar contaminantes de origen externo como tierra, arena y pelos (Baumber-Skaife, 2011).

Volumen

El volumen seminal se divide en dos fracciones, volumen total y volumen sin gel. El volumen se mide en un recipiente graduado, limpio y a temperatura ambiente, o se puede pesar con una balanza. El gel debe ser removido en el momento de la colecta o inmediatamente después. El volumen promedio de un eyaculado es de 66 ml. Presentando una variación estacional e individual que oscila entre 20-200 ml. El volumen seminal total se encuentra influenciado por varios factores: grado de excitación, estación del año (fotoperíodo), tamaño testicular, edad, frecuencia eyaculatoria y comportamiento sexual. Estos factores se encuentran interrelacionados y pueden superponerse. Pero también existen otros como el ambiental, hormonal y drogas que pueden jugar un rol importante. Para poder calcular el número total de células espermáticas en el eyaculado, es necesario medir el volumen del semen sin gel de manera precisa para luego multiplicarlo por la concentración (Squires y col, 2011).

Concentración

La determinación de la concentración se realiza en la porción libre de gel y se expresa en millones de espermatozoides/mililitro. La misma se multiplica por el volumen del eyaculado sin gel para determinar el número total de células espermáticas eyaculadas. Es una de las medidas más importantes para estimar la fertilidad. Se recomienda que un padrillo adulto tenga una concentración de más de 100 millones de espermatozoides por mililitro en el eyaculado. El número total de espermatozoides por eyaculado está sujeto a una variación estacional pero también a un amplio rango de factores como cantidad de eyaculados, edad, tamaño testicular, eficiencia espermatogénica (número de espermatozoide producido por unidad de los testículos), tamaño de las reservas extragonadales de los espermatozoides y enfermedades reproductivas. El número total de espermatozoides por eyaculado obtenido en padrillos maduros tiene un rango de 4000 a 12000 millones, pudiendo llegar hasta los 15000-20000 millones en padrillos que se encuentran en reposos sexual (Blanchard, 2003).

En los laboratorios de reproducción equina, los dos métodos más utilizados para el conteo de espermatozoides son máquinas basadas en la espectrofotometría (espectrofotómetro) o el tradicional hemocitómetro (cámara de Neubauer). Existen equipamientos de tecnología avanzada como ser la citometría de flujo pero es de acceso limitado debido a su elevado costo. Sin embargo, hay herramientas más accesibles que incorporan la tecnología fluorescente como el NucleoCounter SP-100®. También hay aplicaciones para computadoras disponibles como el CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis®) (Baumber-Skaife, 2011).

Motilidad espermática

Es considerada un test fundamental para evaluar la calidad seminal y es probablemente la característica más variable de todas. Actualmente es prueba de rutina a campo y la más utilizada para predecir el potencial de fertilidad del padrillo. Para que un padrillo sea aceptado para refrigerar o congelar semen, debe tener al menos 1000 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Es un

parámetro difícil de estimar porque pequeños errores de manejo nos pueden falsear la estimación. (Baumber-Skaife, 2011).

Morfología

La evaluación de la morfología es una de las prácticas más comunes en el laboratorio para predecir la fertilidad de los machos. Deben ser examinados al menos 100 a 200 espermatozoides para poder evaluar la incidencia de defectos morfológicos, ya que los mismos están asociadas a infertilidad. Las anomalías morfológicas se clasifican en primarias, secundarias o terciarias. Las de origen primario son aquellas asociadas a problemas a nivel de la espermatogénesis, es decir, de origen testicular. Las anomalías secundarias se dan a partir del sistema de conductos excurrentes y las de origen terciario se desarrollan debido a una incorrecta colecta seminal como también por errores en los procedimientos de desarrollo in vitro. Defectos tales como gotas citoplasmáticas distales y colas dobladas, parecen mostrar un menor impacto sobre la fertilidad, mientras que otros como cabezas sueltas, piezas intermedias anormales, gotas proximales, malformaciones de cabeza y acrosoma, cabezas dobles, colas enroscadas y células espermáticas inmaduras, generan importantes efectos sobre la fertilidad (Varner, 2011).

Otros métodos de evaluación

Existe una variedad de pruebas bioquímicas y de fluorescencia para evaluar el estado funcional, metabólico y estructural de estos organelos espermáticos. Entre ellos encontramos la prueba fluorescente específica para potencial mitocondrial conocida como JC-1 y la citometría de flujo. También hay pruebas que detectan la fragmentación o daño de las cadenas de ADN. Estas pruebas requieren de tiempo, trabajo y altos costos, los cuales resultan difíciles de aplicar en la práctica veterinaria de rutina (Baumber-Skaife, 2011, Veeramachaneni, 2011, Schumacher y col, 2011). La termorresistencia es un método para determinar la longevidad espermática. Es

una prueba sencilla de bajo costo, donde se estudian las variaciones en la motilidad espermática en un lapso de tiempo a una temperatura determinada (Varner, 2011).

TRASTORNOS QUE IMPIDEN LA EYACULACIÓN

Se trata de la incapacidad parcial o total para realizar el servicio, reconociéndose dos tipos: Generandi y Coeundi.

Impotencia Generandi

Es la incapacidad o capacidad reducida de fertilidad en el macho. Depende del funcionamiento normal de los testículos, glándulas accesorias y conductos que deben producir y liberar espermatozoides y plasma seminal en cantidades y calidad óptima, dando como resultado una reproducción satisfactoria (Lopez, 2014). La impotencia generandi se caracteriza por deseo sexual normal, capacidad para la copula y eyaculado normal pero con un porcentaje anormal o nulo de fecundación (Lopez, 2014). La alteración generalmente se localiza a nivel testicular reflejándose en una disminución de la calidad espermática. Es una falla en la producción y/o liberación de un número suficiente de espermatozoides viables, con motilidad

progresiva y morfológicamente normales capaces de producir una gestación en la hembra (Facultad de Ciencias Veterinarias, 2013).

Las anomalías observadas a nivel de la célula espermática pueden ser primarias (problemas a nivel testicular: trauma testicular, orquitis, hidrocele, hematocele y neoplasias) secundarias (problemas en el epidídimo o glándulas accesorias) afectando la maduración de los espermatozoides o las terciarias, provocadas por errores de manipulación durante el procesamiento del semen (choque térmico y/u osmótico) o anomalías del eyaculado por la presencia de otras sustancias (sangre, orina u otros contaminantes) (Rimbaud, 2005).

La urospermia es la presencia de orina en el semen. Normalmente la emisión y eyaculación ocurren de manera controlada y sincrónica. En padrillos sanos la emisión precede la eyaculación como resultado de un arco reflejo toracolumbar provocando la contracción del músculo liso del conducto deferente y glándulas accesorias. Este mismo arco reflejo es también responsable de la contracción simultánea del músculo liso del triángulo vesical. Consecuentemente, el eyaculado es liberado hacia la uretra pélvica y al mismo tiempo se previene la evacuación de orina, cuando éste mecanismo falla, el eyaculado se contamina con orina y las tasas de preñez caen abruptamente. Cualquier proceso que interfiera con este arco reflejo puede resultar en urospermia, particularmente sobre el reflejo de cierre del cuello vesical. La neuritis de cauda equina, el herpesvirus tipo I, la toxicosis por sorgo y la cistitis, representan causas primarias de urospermia. Fracturas, osteomielitis y neoplasias que afectan las vías nerviosas a nivel lumbo-sacro son algunas causas secundarias del problema (Turner, 2011).

La piospermia, se caracteriza por la presencia de detritos purulentos, incluyendo leucocitos, restos de tejido y microorganismos patógenos en el eyaculado. La presencia de células blancas (neutrófilos), es indicativo de inflamación en el tracto reproductor y/o urinario (Turner, 2011).

La hemospermia hace referencia a la presencia de sangre en el fluido seminal. Dependiendo del lugar de origen del sangrado, la misma puede presentarse de forma continua en todos los eyaculados o de manera intermitente. Las causas más comunes ocurren a partir de lesiones a nivel uretral o en el pene directamente en casos de trauma, miasis, abronemiasis o exantema coital (Turner, 2011).

La azoospermia es la ausencia de células espermáticas en el eyaculado. No se han reportado casos de esta alteración como tal en los equinos. Puede aparecer en casos graves de oclusión total de las ampollas donde no se aprecien ningún espermatozoide en el eyaculado (McDonnell, 1992).

Impotencia Coeundi

La impotencia coeundi hace referencia a problemas que radican en la imposibilidad de realizar el servicio. Puede deberse a alteraciones primarias a nivel de pene, prepucio o dolor a nivel testicular. Por causas secundarias como problemas a nivel de aplomos, enfermedades musculoesqueléticas, alteraciones neurológicas, falta de libido, trastornos de origen psicógeno o cualquier tipo de dolor que impida al caballo excitarse, saltar, presentar una erección, poder penetrar la hembra y desencadenar la eyaculación de forma normal (Rimbaud, 2005).

Alteraciones de pene y prepucio

Las alteraciones a nivel del órgano reproductor masculino representan un impedimento y un problema cuando se trata de animales destinados a la reproducción.

Laceraciones a nivel peneano y prepucial pueden ocurrir por causas traumáticas, ya sea durante su actividad deportiva (salto), durante la monta debido a los pelos de la cola de la yegua que por fricción y presión producen heridas lacerantes o por trabajar con un maniquí deteriorado. La mayoría de estas heridas, cuando se las atiende correctamente cicatrizan sin mayores inconvenientes. Los hematomas peneanos generalmente son de etiología traumática, provocados por yeguas agresivas o pastoreo con otros animales (Schumacher y col, 2011).

La fimosis es la incapacidad de protruir el pene a causa de una estenosis a nivel del anillo prepucial; esta puede ser congénita o adquirida. También puede evidenciarse la presencia de tumores como el carcinoma impidiendo la protrusión peneana. La parafimosis es la incapacidad de reintroducir el pene dentro de la cavidad prepucial, causada por traumatismos. (Schumacher y col, 2011).

El priapismo se caracteriza por una erección persistente sin estimulación sexual presente. Su incidencia es poco frecuente pero cuando sucede es un motivo de preocupación debido a que no tiene recuperación. Este tipo de problemas ocurre generalmente luego de la administración de tranquilizantes fenotiazínicos como la acepromacina. También se reportaron casos luego de la anestesia general por lesión de nervios (Schumacher y col, 2011).

La neoplasia de mayor incidencia a nivel del aparato reproductor es el carcinoma de células escamosas. Otros tumores encontrados incluyen papilomas, sarcoides y melanomas (Schumacher y col, 2011).

La habronemiasis es una enfermedad cutánea provocada por la infestación de heridas por la larva del gusano del estómago (Habronemaspp). Esta larva penetra la piel intacta del animal provocando lesiones en zonas húmedas como a nivel de pene y prepucio (Schumacher y col, 2011).

Causas extra genitales

Existen causas que disminuyen la capacidad de realizar el servicio correctamente. Factores que actúan sobre la libido como la edad, experiencias anteriores con hembras agresivas, estrés, lesiones neurológicas, físicas (trauma, cauda equina, trombosis iliofemoral, laminitis) y hormonales. Las alteraciones a nivel de aplomos son también consideradas una causa secundaria de impotencia en los machos (Rimbaud, 2005).

El bloqueo de las ampollas se origina en el segmento terminal del conducto deferente debido al estrechamiento del mismo antes de comunicarse con el colículo seminal. La incidencia de este problema alcanza un máximo de 30-40% cuando los padrillos presentan largos períodos de abstinencia sexual y se da sobre todo en padrillos hiperproductores de espermatozoides (Rimbaud, 2005).

Los desórdenes observados con mayor frecuencia según McDonnell fueron a nivel de los procesos de emisión y expulsión como también de incontinencia urinaria durante la eyaculación. Se han reportado con menor frecuencia problemas de eyaculación precoz, eyaculación parcial y eyaculación azoospermica (McDonnell, 1992). Las fallas en la emisión y en la expulsión pueden ser intermitentes o continuas, a pesar de tener un comportamiento sexual normal (montar a la yegua y generar empujes). Como consecuencia de estos problemas, el padrillo puede adquirir un comportamiento agresivo y algunos pueden llegar a perder el interés sexual (McDonnell, 1992).

Alteraciones en la monta e intromisión

Muchas de las fallas en la emisión y expulsión pueden tener su origen a nivel musculoesquelético mostrando signos de dolor y debilidad como también a nivel neurológico. Signos clínicos que reflejen dolor a nivel de columna, extremidades posteriores o a nivel urogenital, son determinantes para poder realizar el acto copulatorio correctamente (Benson y col, 2011).

Algunos problemas físicos que pueden estar asociados incluyen, al esparaván óseo, pleuritis, lesiones a nivel de casco (abscesos, abrasiones), torsión del cordón espermático, lesiones a nivel testicular y/o peneano. Enfermedades circulatorias como las trombosis aórtico- ilíacas se manifiestan a través del dolor, debilidad e incoordinación (Benson y col, 2011).

Padrillos con alteraciones neurológicas, generalmente muestran dificultad al momento de la intromisión y particularmente son incapaces de mantener la estabilidad encima de la hembra o maniquí (Benson y col, 2011). Las enfermedades neurológicas y musculoesqueléticas representan alrededor del 50% de los problemas. Estas alteraciones se hacen evidentes al momento de la monta, cortejo e intromisión. El animal puede presentar un control propioceptivo del pene disminuído al momento de la intromisión, teniendo que realizar un esfuerzo muy grande para eyacular dentro de la hembra (Benson y col, 2011).

Trastornos eyaculatorios de origen psicógeno

Existen varios ejemplos de casos específicos de trastornos eyaculatorios que tienen un fuerte componente psicógeno. Determinados incidentes con la vagina artificial en donde el padrillo se quema debido a una excesiva temperatura, traumas relacionados a montas pasadas con yeguas agresivas, incorrecta colocación de la banda elástica que sujeta el condón, mal manejo en el momento previo a la eyaculación, suelos resbaladizos que resultan inestables para realizar el salto. En esas situaciones es común que el animal realice la mímica copulatoria pero de manera distraída sin llegar a eyacular. Otro problema radica en ocasiones cuando tenemos un padrillo sumiso junto con otro dominante, la presencia del mismo hace que el sumiso pierda la libido y el interés por las yeguas, siendo un problema a la hora de trabajar. También ocurre en machos que son maltratados por el padrillero,

siendo difícil la colecta en presencia de dicha persona. A su vez, estos trastornos se observan en padrillos que hayan utilizado anillos peneanos, bragueros o cualquier otro dispositivo utilizado para evitar la masturbación sobre todo en studs de Pura Sangre de Carreras (McDonnell, 1992).

ENFOQUES TERAPÉUTICOS A LOS TRASTORNOS EYACULATORIOS

Ante la presencia de cualquier problema relacionado al comportamiento sexual del padrillo como los nombrados anteriormente, es fundamental contar con determinadas herramientas y alternativas para lograr extender la vida reproductiva de los mismos. Un plan sistemático y terapéutico que abarque tanto la parte comportamental y de manejo como también la farmacológica, son claves para lograr el éxito de nuestro objetivo (McDonnell, 1992).

Comportamiento y manejo

Es importante trabajar sobre el medio ambiente, debemos tener en cuenta el momento del ciclo estral de la yegua a utilizar ya que tiene que estar receptiva a la monta. El padrillero debe conocer el carácter del animal y generar estímulos positivos que no repriman su comportamiento, evitar gritos y actitudes que lo molesten. Si el padrillo presenta algún tipo de lesión o signo de dolor, debe tratárselo con inmediatez para que no interfiera en el desempeño reproductivo. Es importante destacar que ni la erección ni la monta son requisitos determinantes para que la eyaculación se lleve a cabo. En estos casos, la eyaculación puede darse con el padrillo en estación a partir de la estimulación manual sobre la base del órgano. Es buena practica ajustar el maniquí o la yegua a la altura del padrillo, proporcionarle agarres o lugares de fijación para que los padrillos con cierta dificultad puedan trabajar mejor y que el área de colecta sea un ambiente tranquilo y libre de distracciones (McDonnell, 1992).

Fármacos

Estudios realizados se han basado principalmente en mejorar los procesos de emisión y expulsión del semen, promoviendo y mejorando principalmente la actividad del músculo liso. Casi todas las drogas estudiadas que actúan sobre este tipo muscular presentan efectos secundarios a dosis dependiente, tanto positivos como negativos sobre la función copulatoria y la libido. Cabe destacar que dichos efectos presentan una variación individual importante. La alternativa farmacológica debe considerarse una opción luego de comprobar infructuosos otros enfoques terapéuticos (McDonnell, 1992).

Agentes adrenérgicos (Xilacina)

La xilacina, es un agonista alfa 2 adrenérgico comúnmente usado para provocar sedación y analgesia en caballos (Booth, 1988). Trabajos realizados con esta droga revelaron una tasa de éxito de 27% en inducir la eyaculación ex copula en padrillos. También es utilizada clínicamente para inducir la eyaculación en padrillos con problemas neurológicos o de claudicación que impiden el acto copulatorio. La experiencia hasta el momento sugiere que las tasas de éxito dependen tanto del nivel de excitación sexual como del estado de ansiedad del caballo (calmo vs nervioso) al momento del tratamiento. Estudios controlados así como la clínica revelaron que los padrillos fallan en eyacular, al menos que se encuentren completamente tranquilos en un ambiente familiar y sin distracciones durante el proceso. Estos requisitos en el control del ambiente son importantes para poder lograr un tratamiento exitoso. También se notó un aumento en los porcentajes de eyaculación cuando los padrillos fueron estimulados sexualmente antes del tratamiento. Tanto el manejo como las dosis y drogas utilizadas van a depender del factor individual de cada padrillo y del problema que estos presenten (McDonnell y Odian, 1994).

Antidepresivos tricíclicos (Imipramina)

Son agentes ampliamente usados en casos de depresión, ansiedad y desórdenes obsesivos- compulsivos en humanos, éste tipo de drogas son conocidas por alterar

la función eyaculatoria (McDonnell, 1992). El clorhidrato de imipramina, un antidepresivo tricíclico, inhibe la captación de varios neurotransmisores como la Dopamina, Norepinefrina y Serotonina (Baldessarini, 1985). Este tipo de antidepresivos han sido utilizados en hombres para el tratamiento contra la aspermia (Kelly y Needle, 1979) eyaculación precoz (Girgis y col, 1982) y eyaculación retrógrada (Brooks y col, 1980, Eppel y Berzin, 1984). En el tratamiento contra la eyaculación precoz en humanos actúa como ansiolítico al miedo a la eyaculación precoz (Girgis y col, 1982). En casos de eyaculación retrógrada en hombres con diabetes, no solo está comprobado que la imipramina puede corregir la eyaculación retrógrada sino que también es posible la concepción (Eppel y Berzin, 1984).

En caballos la imipramina induce un estado de somnolencia, erección y masturbación. Esta droga también demostró facilitar la eyaculación durante la masturbación, la copula o la colecta de semen con vagina artificial en equinos (McDonnell y Odian, 1994). En los equinos, el uso de imipramina a bajas dosis (500 a 800 mg/ iv), induce la erección y masturbación como también parece disminuir el umbral de excitación. La administración de imipramina (100 a 500 mg/ kg oral) parece mejorar la eyaculación durante la copula en padrillos que sufren de problemas eyaculatorios crónicos (McDonnell, 1991). Este protocolo también ha sido útil en el tratamiento contra la urospermia en equinos (McDonnell, 1992).

Otras drogas utilizadas

Prostaglandina

La prostaglandina se caracteriza por ser un ácido graso de cadena larga, formada por 20 átomos de carbono llamados eucosanoides. La misma es sintetizada a partir de la vía de las cicloxigenasas a través del ácido araquidónico (Pinto, 2014).

El uso de soluciones inyectables de preparaciones de prostaglandina F2alfa ha revolucionado el manejo reproductivo tanto en equinos como en bovinos desde que fue identificada como la principal hormona luteolítica (Pinto, 2014). La administración de prostaglandina F2alfa es relativamente segura a dosis entre 20 y 40 veces

mayores que las dosis terapéuticas (5–10 mg/kg de dinoprost) sin mostrar efectos tóxicos. Ni siquiera dosis de hasta 800 mg/kg fueron fatales a pesar de estar asociadas a fuertes efectos secundarios como quedar echado en posición lateral. Los efectos secundarios comúnmente observados luego de su administración pueden ser, sudoración pronunciada, disconfort abdominal, incoordinación, ataxia y diarrea. La aparición y duración de los mismos presentan una variación individual. Es importante destacar que estos efectos secundarios son a dosis dependiente y generalmente desaparecen a la hora de su aplicación (Pinto, 2014). Tanto la prostaglandina F2alfa como la prostaglandina E han sido utilizados en otras especies con efectos positivos sobre el comportamiento reproductivo y la eyaculación. En equinos hay muy pocos estudios realizados sobre los efectos de las mismas sobre el comportamiento reproductivo (McDonnell, 1992).

Oxitocina

La oxitocina se produce en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, se libera a partir de la neurohipófisis. Es transportada a través de terminaciones nerviosas desde el cerebro al corazón y desde ahí a todo el cuerpo, activando y modulando una variedad de funciones y emociones (Lopez y col, 2014). Su uso clínico más común se observa para la evacuación de fluidos uterinos, la inducción del trabajo de parto y el manejo de retención placentaria. Su administración resulta de contracciones uterinas durante 30 a 45 minutos. Su administración durante el período de diestro (antes del día 10) puede resultar en la persistencia del CL y supresión del estro subsecuentemente (McCue, 2013).

Ha sido de utilidad en casos de padrillos que presentan oclusión a nivel de las ampollas promoviendo la acción del músculo liso removiendo el tapón espermático, 10 a 20 UI/ iv para un caballo de 450 kg administrada antes de la monta o colecta junto con masajes sobre las ampollas vía rectal, repitiendo el protocolo hasta obtener un eyaculado normal (McDonnell, 1992).

Ansiolíticos, Analgésicos, GnRH y Testosterona

Aquellos agentes que mejoran la excitación general, son beneficiosos para lograr que el animal eyacule (McDonnell, 1992). El diazepam es el más usado como agente ansiolítico aumentando indirectamente la libido. Este debe administrarse a una dosis de 0,05 mg/kg lentamente vía i/v 5 a 7 minutos antes del servicio. En casos donde el dolor físico sea lo que esté impidiendo que el animal trabaje, se realizan tratamientos con fenilbutazona a una dosis de 1 a 2 grs. vía oral cada 12 horas durante 10 días (McDonnell, 1992).

El uso de GnRH actúa aumentando la libido y la producción de espermatozoides provocando un aumento en los niveles de testosterona. Se ha usado un régimen de 50 ug/kg de GnRH vía subcutánea o intramuscular 1 a 2 horas previo al servicio.

Los fármacos que facilitan la eyaculación incluyen la xilacina, imipramina, detomidina y prostaglandina (McDonnell, 2001).

PROTOCOLOS FARMACOLÓGICOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA EYACULACION EX COPULA.

Los protocolos farmacológicos reportados para lograr la eyaculación ex copula en padrillos incluye una variedad de dosis, horarios, vías de administración, combinación de drogas y procedimientos previos a la inducción. De las fuentes bibliográficas consultadas, los protocolos que se han puesto en práctica han sido los siguientes. Xilacina a una dosis de 0,66 mg/kg i/v con una tasa de éxito de 27% y n=28 (McDonnell y Love, 1991), imipramina a una dosis de 2 mg/kg i/v con una tasa de éxito de 42% y n=5 (McDonnell y Turner, 1994), imipramina + xilacina a una dosis de 2 mg/kg de imipramina i/v seguido por 0,3 mg/kg de xilacina i/v luego de 10 minutos mostrando un éxito de 53% y n=5 (McDonnell y Turner, 1994), imipramina +

xilacina a una dosis 0,75 a 2,0 mg/kg de imipramina oral seguido luego de 1 a 3 horas por 0,3 mg/kg de xilacina i/v con una tasa de éxito 68% y n=8 (McDonnell, 2001). Se ha recabado información de estudios con prostaglandina F2alfa a dosis de 0,01 a 0,15 mg/kg i/m con una tasa de éxito de 75% y n=8 (McDonnell, 1992).

Las características de cada eyaculado varían significativamente entre los distintos protocolos farmacológicos, aparentemente asociado a la variable excitación o inhibición del músculo liso de las glándulas accesorias (McDonnell, 2001). El semen obtenido usando solamente xilacina, muestra un volumen, concentración, pH y número total de espermatozoides similar al eyaculado obtenido por monta natural (McDonnell y col, 1991). En este protocolo, los resultados mostraron que el éxito de la eyaculación dependió del nivel de excitación del padrillo al momento del tratamiento (McDonnell, 2001). En los protocolo de xilacina y xilacina + imipramina (oral o i/v), la mayoría de las eyaculaciones ocurrieron dentro de los primeros 3 minutos de la administración de la misma, al comienzo de la sedación o entre los 15 y 25 minutos, a medida que el animal iba saliendo del plano (McDonnell y col, 1991, McDonnell y col 1994, Card y col, 1997, Johnston y col, 1998). El único efecto adverso constatado fue una leve a moderada sedación con el animal en estación durante los siguientes 15 minutos (McDonnell, 2001, McDonnell y col, 1991, McDonnell y col, 1994, Card y col, 1997, Johnston y col, 1998).

Los tratamientos con imipramina o detomidina parecen inhibir las contracciones de las glándulas accesorias resultando en eyaculados de poco volumen, alta concentración espermática, mayor número total de espermatozoides y pH más bajo que los eyaculados obtenidos por monta natural (McDonnell y Odian, 1994, McDonnell y Turner, 1994). Con el protocolo de imipramina intravenosa, la eyaculación ocurrió dentro de los 10 a 45 minutos (McDonnell y Turner, 1994). La administración oral de imipramina presenta ventajas sobre aquella administrada vía intravenosa ya que la vía oral es más fácil en casos de personal poco experiente además de no provocar hemólisis en el lugar de administración, como sí ocurre usando la vía endovenosa (McDonnell, 2001).

Los tratamientos realizados con prostaglandina F2alfa parecen promover las contracciones de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de mayor volumen, menor concentración espermática, número total de espermatozoides similar al obtenido por monta natural, cantidades significativas de gel y un pH más alto. Con prostaglandina F2alfala eyaculación ocurre generalmente entre 10 a 50 minutos luego de la administración intramuscular. Se observaron importantes efectos no deseados como ser, sudoración, calambres abdominales y goteo de orina. Estos generan un desafío desde el punto de vista práctico al momento de obtener una muestra libre de contaminantes como la orina, transpiración, detritos y microorganismos (McDonnell, 1991, McDonnell, 2001).

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Obtener un eyaculado mediante inducción química ex copula de padrillos sexualmente maduros.

Objetivos particulares

- Describir los parámetros espermáticos, volumen total, volumen gel-free, concentración, número total de espermatozoides (NTE), motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), vigor (V) y morfología de los eyaculados obtenidos mediante inducción química.

- Comparar los parámetros espermáticos de un mismo padrillo obtenidos con vagina artificial (in copula) de los obtenidos con inducción farmacológica (ex copula).
- Evaluar los efectos colaterales de las drogas durante el procedimiento.
- Determinar el tiempo que demoran en eyacular los padrillos una vez aplicado el tratamiento farmacológico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y animales

La práctica se realizó en el Haras P´ Compadre de caballos de hipismo, Ruta 11 km 145 Estación Pedrera, Canelones, Uruguay. Se utilizaron dos padrillos de raza Holsteiner de fertilidad probada, de 6 y 9 años de edad con 420 y 500 kg de peso vivo respectivamente. Ambos animales se encontraban en entrenamiento, bajo las mismas condiciones ambientales y de manejo. Los dos padrillos se alojaban en boxes individuales durante la noche y en piquetes individuales durante el día. Su dieta consistía en fardos de alfalfa, ración balanceada tres veces al día y agua ad libitum. Estos padrillos ya han sido utilizados para cubrir yeguas en temporadas anteriores.

Previo al ensayo, a los padrillos se les colectaba semen por medio de la utilización de vagina artificial como parte del programa reproductivo del establecimiento.

Diseño experimental

Cada padrillo fue sometido a un total de 3 tratamientos farmacológicos idénticos, con un intervalo entre los mismos de 2 días en el mes de Octubre del año 2015. De acuerdo al método descrito por SueMcDonell (2001) realizamos un tratamiento el cual consistió en la administración oral de imipramina (Tofranil®Pamoato 75 mg, Novartis, Brasil) un psicofármaco de uso humano, a una dosis de 3 mg/kg, seguido

dos horas después por una inyección intravenosa de 0,66 mg/kg de xilacina al 10% (Xylased® 10, Vetcross, Montevideo, Uruguay).

Para la preparación de la medicación oral, de acuerdo al método utilizado por Sue McDonnell, se disolvió el contenido de las cápsulas de imipramina en agua destilada en una jeringa de 20 ml. Una vez administrada la imipramina, se dejó al animal suelto dentro del box durante 2 horas. Durante esas dos horas se procedió a la preparación del dispositivo de colecta así como la dosis de xilacina. El mismo constó de un recipiente plástico (guante de tacto), sujetado por un aro de alambre de unos 25 cm de diámetro y dos hilos de fardo.

Diez minutos antes de la aplicación de la xilacina se sacó al padrillo del box y se lo estimuló sexualmente por unos 10 minutos con una yegua en celo. Una vez estimulado, se le colocó el dispositivo de colecta sobre el prepucio y se le administró la xilacina i/v. Se dejó al animal suelto dentro del box con el dispositivo de colecta colocado colgando sobre el prepucio y se lo observó durante los siguientes 30 minutos, en condiciones de oscuridad y mayor tranquilidad posible. Si el padrillo no eyaculó pasados los 30 minutos de la aplicación de la xilacina se lo consideró como sin respuesta al tratamiento.

Dos días después del tercer y último tratamiento se le colectó semen in copula a ambos padrillos con vagina artificial modelo Hannover, utilizando una yegua en celo para su posterior evaluación y comparación con el eyaculado obtenido farmacológicamente.

Evaluación de semen

El semen fue evaluado en el Laboratorio de Teriogenología de la Facultad de Veterinaria UDELAR. el eyaculado obtenido in copula con vagina artificial, como el obtenido ex copula fueron evaluados y registrados inmediatamente de acuerdo con

Kenney y col, (1983) en cuanto a aspecto, volumen gel, volumen gel-free, concentración, número total de espermatozoides (NTE), motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), vigor (V) y morfología.

Evaluación de los posibles efectos secundarios

Antes de comenzar con el tratamiento y 60 minutos después de terminado el tratamiento, se tomó y registró la frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y la temperatura corporal (TC). Durante el tratamiento se observó grado de sedación, sudoración, presencia o ausencia de contracciones musculares, protrusión y erección del pene, presencia o ausencia de masturbación, presencia o ausencia de micción y conducta general de cada padrillo.

Análisis estadístico

Debido al bajo número de animales y muestras procesadas, ningún método estadístico fue utilizado para evaluar los resultados. Se procedió a analizar los datos de manera descriptiva.

8. RESULTADOS

Como lo demuestran los resultados de las tablas, se obtuvo una tasa de éxito de 16,6% de seis intentos, tres por cada padrillo (Tabla 1 y 2). El eyaculado obtenido farmacológicamente podría ser apto para utilizarse en planes de inseminación artificial (IA) o criopreservación. El eyaculado inducido farmacológicamente ocurrió a los 20 minutos de aplicada la xilacina intravenosa, correspondiendo con el momento de salida del plano de sedación. No se apreciaron efectos secundarios importantes (Tabla 4 y 5), ni se alteraron los parámetros fisiológicos de frecuencia respiratoria, cardíaca y temperatura corporal con los tratamientos.

Tabla 1: Tasa de éxito por número de ensayo

Ensayos	Padrillo N° 1	Padrillo N° 2
1	-	-
2	-	+
3	-	-

(-) No hubo éxito en obtener un eyaculado ex copula

(+) Hubo éxito en obtener un eyaculado ex copul

Tabla 2: Tasa de éxito por padrillo

Padrillo	Eyaculó
Padrillo N° 1	-
Padrillo N° 2	+

(-) No hubo éxito en obtener un eyaculado ex copula

(+) Hubo éxito en obtener un eyaculado ex copula

Tabla 3: Comparación de los eyaculados obtenidos con vagina artificial e inducción farmacológica.

Parámetros	Eyaculados in copula	Eyaculado ex copula
------------	----------------------	---------------------

Volumen Gel-free (ml)	70	25
Volumen gel (ml)	10	0
Concentración (x 10 ⁶)	62	176
NTE (x 10 ⁶)	4340	4400
Motilidad total (%)	80	80
Motilidad progresiva (%)	70	70
Vigor (1 – 4)	4	4
Morfología Normal (%)	67	70

NTE: número total de espermatozoides.

Tabla 4: Efectos colaterales de los tratamientos en el padrillo N° 1.

Padrillo N° 1	Sensorio	Grandes Funciones	Actitudes anómalas	Protrusión de pene
T 1	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente
T 2	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente
T 3	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente

T 1: tratamiento 1

T 2: tratamiento 2

T 3: tratamiento 3

Tabla 5: Efectos colaterales durante los tratamientos en el padrillo N° 2

Padrillo N° 2	Sensorio	Grandes Funciones	Actitudes anómalas	Protrusión de pene
T 1	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente
T 2	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente
T 3	Somnolencia	Ninguna	Sudoración y espasmos abdominales	Presente

9. DISCUSIÓN

El tratamiento con imipramina / xilacina resultó en la inducción de la eyaculación en 1 de 6 intentos (16,6%) en dos padrillos sexualmente maduros y con función eyaculatoria normal. El mismo protocolo probado a nivel internacional mostraron tasas de éxito que variaron entre un 4 a 68%. En nuestro caso, la tasa de éxito fue significativamente inferior a la obtenida por algunos autores y similar a las obtenidas por otros (McDonnell y Love, 1991); (McDonnell y Turner, 1994); (McDonnell, 1992); (McDonnell, 2001). Algunos ensayos utilizaron caballos reproductivamente sanos, mientras que otros utilizaron padrillos con trastornos eyaculatorios.

Esta variación tan amplia se debe probablemente a las diferencias en las dosis, vías de administración utilizadas para cada fármaco y a las respuestas individuales de cada padrillo al protocolo. McDonnell y Love (1991) tuvieron una tasa de éxito de 27% en 56 intentos utilizando 28 padrillos, solo con xilacina; mientras que Rowley y col (1999), obtuvieron eyaculaciones en un 50% de 14 intentos utilizando un solo padrillo Poney con detomidina.

La baja tasa de éxito obtenida en nuestro estudio en comparación con las obtenidas por otros investigadores, probablemente se deba a las siguientes razones. El número de padrillos ($n= 2$) y la cantidad de intentos ($n= 6$) utilizados en nuestro trabajo fue significativamente menor. Otro inconveniente fue que el HarasP`Compadre recibía muchas visitas diarias. Esto dificultaba mucho mantener las condiciones de silencio y tranquilidad necesarias para el experimento debido a la cantidad de personas y vehículos circulando en el haras incluso cerca de los boxes donde trabajábamos. Si bien, una vez tratado los padrillos se los dejó en un box individual, no se logró un ambiente lo suficientemente calmo y libre de distracciones. Tampoco pudimos lograr un ajuste individual de las dosis para cada padrillo, sabiendo que hay una gran variabilidad individual de respuesta a las drogas utilizadas. Cabe mencionar que fue difícil conseguir padrillos para realizar el experimento. Esto se debía a que nos encontrábamos en plena temporada reproductiva y que los dueños no confiaban de la seguridad de las drogas.

Con relación a las características del eyaculado obtenido por inducción farmacológica, podemos decir que cumple con las características de un eyaculado normal in copula según lo descrito por Kenney en 1983. No existieron diferencias entre las características del eyaculado obtenido con vagina artificial del obtenido farmacológicamente ex copula. Durante la evaluación seminal, pudimos constatar que el eyaculado inducido fue de menor volumen, menor cantidad de gel, mayor concentración y mayor NTE que el eyaculado obtenido in copula. La mayor diferencia se observó en la concentración espermática donde el eyaculado inducido resultó 2,8 veces más concentrado que el obtenido por vagina artificial. Las

características del eyaculado ex copula sugieren un aumento en la emisión de la fracción rica de espermatozoides y una disminución en la emisión de los fluidos provenientes de las glándulas accesorias, probablemente debido a la acción de la imipramina. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (McDonnell y col, 1991, Clarie y col, 1997, McDonnell, 2001).

Durante cada tratamiento fueron observados los efectos colaterales y podemos afirmar que fueron los mismos que los reportados por las diferentes referencias bibliográficas consultadas (moderada sedación, protrusión peneana, de ausente a moderada erección, contracciones abdominales y leve sudoración). No se modificaron los parámetros fisiológicos de frecuencia cardíaca, respiratoria ni temperatura. Por lo tanto, podemos decir que son drogas sumamente seguras para su utilización en padrillos con problemas eyaculatorios.

10. CONCLUSIÓN

Consideramos este tema de gran interés, ya que nos va a permitir utilizar padrillos genéticamente valiosos que de otro modo serían descartados por no poder ser empleados como reproductores. De acuerdo a los antecedentes y a nuestro resultado exitoso, la práctica de este protocolo permite la obtención de eyaculados ex copula en padrillos imposibilitados de realizar una monta natural. Teniendo en cuenta los parámetros espermáticos evaluados en el presente trabajo, las muestras son aptas tanto para la técnica de inseminación artificial como para la criopreservación del semen. Debido a la gran variabilidad en las tasas de éxito tanto

entre padrillos como en un mismo padrillo, creemos que es una técnica más aplicable para la criopreservación de semen que para su uso en fresco, ya que para esto último se precisa de una coordinación en el tiempo entre la inducción del eyaculado y la ovulación de la yegua.

Estas drogas son drogas seguras y su uso no afecta la salud general de los padrillos ya que los efectos colaterales son leves y pasajeros. Para en un futuro lograr mejores resultados, sería necesario disminuir al máximo las variables externas, haciendo un estudio más controlado y con mayor número de padrillos. Es fundamental, realizar cada paso de la técnica de manera adecuada para evitar variables que impidan el éxito. También, sería interesante congelar el semen obtenido farmacológicamente y hacer estudios de índices de fecundación y concepción que avalen su uso en la clínica diaria.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams G.P, Ralto M.H, Collins C.W, Bergfelt D.R (2009) Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*;71:166-175.
- 2) Amann R.P, Graham J.K (2011) Spermatozoal Function. En: McKinnon, A.O, Squires, E.L, Vaala W. E, Varner, D.D. *Equine Reproduction*. 2a. ed. Ames, Blackwell. V 1, p. 1053- 1083.

- 3) Amann R.P (2011) Functional Anatomy of the Adult Male. En: McKinnon, A.O, Squires, E.L, Vaala W. E, Varner, D.D. Equine Reproduction. 2a. ed. Ames, Blackwell. V 1, p. 868-880.
- 4) Amann R.P (2011) Physiology and Endocrinology. En: McKinnon, A.O, Squires, E.L, Vaala W. E, Varner, D.D. Equine Reproduction, 2a. ed. Ames, Blackwell. V 1, p. 881-908.
- 5) Baldessarini (1985) Disponible en: https://books.google.com.uy/books?id=59J7BwAAQBAJ&pg=PA310&lpg=PA310&dq=Baldessarini+1985+Serotonin&source=bl&ots=gheS_1FLSU&sig=_x7tV40BVn-nT3nHrx078OP_kpw&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj7w93PmNfMAhXKqB4KHZ3aA3MQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Baldessarini%201985%20Serotonin&f=false . Fecha de consulta: 20/02/16
- 6) Baumber-Skaife J. (2011) Evaluation of Semen. En: McKinnon, A.O, Squires, E.L, Vaala W. E, Varner, D.D. Equine Reproduction, 2a. ed. Ames, Blackwell. V 1, p. 1278- 1291.
- 7) Bielli A. (2002) Regulación hormonal de la función reproductiva en el macho, En: Ungerfeld R. Reproducción en los animales domésticos. Montevideo, Melibea, V 1, p. 81-94.
- 8) Blanchard L.T, Varner D.D, Schumacher J, Love C.C, Brinsko S.P, Rigby S.L (2003) Examination of the Stallion for Breeding Soundness. En: Blanchard L.T, Varner D.D, Schumacher J, Love C.C, Brinsko S.P, Rigby S.L Manual of Equine Reproduction. 2a.ed. Saint Luis. Mosby. p.142-164.
- 9) Brass K. (2001) Inseminación Artificial en la especie Equina. En: Gustavo A Palma, Biotecnología de la reproducción. Buenos Aires. Hemisferio Sur p.525- 562.

- 10) Brinsko (2011) Semen collection techniques and insemination procedures. En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W. E, Varner D.D. Equine Reproduction, 2a. ed. Ames. Blackwell. V 1, p. 1268-1277.
- 11) Brindley (1989) Hypogastric Plexus Stimulators for Obtaining Semen from Paraplegic Men. British Journal of Urology 64:72-77.
- 12) Benson B.M.Jr, McDonnell S.M (2011) Lameness in Breeding Stallions and Broodmares. En: Ross W.M, Dyson S.J. Diagnosis and Management of Lameness in the Horse. 2a.ed. Missouri. Elsevier. p. 1235-1242.
- 13) Booth, N.H (1988) Nonnarcotic analgesics. En: Booth, N.H. and McDonald, L.E. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State. Ames p. 351-359.
- 14) Brooks M.E, Berzin M, Braf Z (1980). Treatment of retrograde ejaculation with imipramine. Urology 15:353-355.
- 15) Card C.E, Manning S.T, Bowman P, Leibel T (1997) Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in disable stallion. Canadian Veterinary Journal 38:171-174.
- 16) Coffman E.A, Pinto C.R, (2014) The use of prostaglandin F2alpha for controlling the mare's estrous cycle. Proceedings of the American Association of Equine Practicioners, Annual Convention, Nashville, 59: 337-341.
- 17) Collins C.W, Songsasen N, Monfort S.L, Bush M, Wolfe B, James S.B, Wildt D.E, Pukazhenthil B.S. (2006) Seminal traits in the Przewalski's horse following electroejaculation. Animal Reproduction Science 94:46-49.

- 18) Corona G, Mannucci E, Petrone L, Fisher D.A, Balercia G, De Scisciolo G, Pizocarro A, Giommi R, Chiarini V, Forti G, Maggi M (2006) Psychobiological Correlates of Delayed Ejaculation in Male Patients With Sexual Dysfunctions, *Journal of Andrology*, 27 (3):453-458.
- 19) Dyce K.M, Sack W.O, Wensing C.J.G (2007) *Anatomía Veterinaria*, 3a.ed. México. El Manual Moderno p.920.
- 20) Dyce K.M, Sack W.O, Wensing C.J.G (1999) *Anatomía Veterinaria* 2a.ed. México. McGraw-Hill Interamericana. p.952.
- 21) Eppel S.M, Berzin M (1984) Pregnancy following treatment of retrograde ejaculation with clomipramine hydrochloride. *South African Medical Journal*.66:889-891.
- 22) Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Cátedra de Semiología (2013). *Semiología del aparato reproductor macho*. Disponible en: <http://www.fvet.uba.ar/areas/semiologia/2913/Reproductor-macho.pdf>. Fecha de consulta: 06/02/2016.
- 23) Feary D.J, Moffett P.D, Bruemmer J.E, Southwood. L, McCue. P, Niswender. K.D, Dickinson.C, and Traub-Dargatz. J (2005) Chemical ejaculation and cryopreservation of semen from a breeding stallion with paraphimosis secondary to priapism and haemorrhagic colitis, *Equine Veterinary Education* 17: 299-304.
- 24) Ferrari A, Sader M, Perez F, Lopez D, Recuero M (2012). *Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay*, Informe Uruguay XXI Promoción de inversiones y exportaciones. Disponible en: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/es/wp-content/uploads/sites/6/2012/04/Ecuestre-Informe-Final-Marzo-2012.pdf>. Fecha de consulta: 15/08/2015.

- 25) Girgis S.M, El-Haggag S, El-Hermouzy S (1982) A Double-Blind Trial of Clomipramine in Premature Ejaculation. First International Journal of Andrology 14:364-368. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6751156> Fecha de consulta: 05/09/15.
- 26) Giuliano F, Clement P (2005) Physiology of Ejaculation: Emphasis on Serotonergic Control, European Urology 48: 408- 417.
- 27) Götze, R. (1949) Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Hannover: ScharperVerlag.
- 28) Johnson L, Griffin C.E, Martin M.T (2011) Spermatogenesis. En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E, Varner D.D. Equine Reproduction. 2a.ed. Ames, Blackwell. V 1 p.1026-1052.
- 29) Johnson L, Neaves W.B (1981) Age-Related Changes in the Leydig Cell Population, Seminiferous Tubules and Sperm Production in Stallions Biology of Reproduction 24: 703-712.
- 30) Johnston P.F, DeLuca J.L (1998) Chemical ejaculation of stallion after the administration of oral imipramine after intravenous xylazine, Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 44: 59-62.
- 31) Juhasz J, (2000) Methods of semen and Endocrinological Evaluation of the Stallion. ActaVeterinariaBrunensis 69: 247-259.
- 32) Kelly M.E, Needle M.A (1979) Imipramine for Aspermia After Lymphadenectomy. Urology 13(4):414-415.

- 33) Kenny, R.M, Hurtgen, J. Pierson, R. Witherspoon, D. Simons, J. (1983). Manual for clinical fertility evaluation of stallion. Hastings, Nebraska, Society for Theriogenology. p. 100.
- 34) Klug E. (1982) Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes – die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz. Tese (Livro Docência em Medicina Veterinária) – Escola Superior de Veterinária, Hannover, Alemanha.
- 35) Kosiniak K. (1975) Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. Journal of Reproduction and Fertility 23: 59-61.
- 36) López R.CE, Arámbula A.J, Camarena P.EE. (2014) Oxitocina, la hormona que todos utilizan y que pocos conocen. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobs/mex/gom-2014/gom147f.pdf> . Fecha de consulta: 06/02/16.
- 37) López J. (2014) Infertilidad e impotencia en el macho. Disponible en: <http://reproduccion-veterinaria.webnode.com.uy/patologias-de-la-reproduccion/patologias-del-macho/impotencia/>. Fecha de consulta: 06/02/2016.
- 38) McCue (2013) Proceedings of the 13th International Congress of the World Equine Veterinary Association WEVA. Colorado State University, Clinical Science. Budapest. Disponible en: <http://cvmbs.colostate.edu/Documents/Learnmares22-hormther-oxytocin-apr09.pdf>. Fecha de consulta: 20/11/2015.
- 39) McDonnell S.M (1992) Ejaculation. Physiology and Dysfunction, Veterinary clinics of North America Equine Practice 8 (1): 57-70.

- 40) McDonnell S.M (2001) Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science* 68: 153–159.
- 41) McDonnell S.M, García M.C, Kenney R.M, (1987) Pharmacologic manipulation of sexual behavior. *Journal of Reproduction and Fertility* 35: 45-49.
- 42) McDonnell S.M, Love C.C, (1991) Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 36 (1): 73-76.
- 43) McDonnell S, Martin B.B (2003) Lameness in breeding stallions and broodmares. En: *Equine Lameness*. Philadelphia, Saunders p.1077-1084.
- 44) McDonnell S.M, Odian M.J, (1994) Imipramine and xylazine- induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 41: 1005-1010.
- 45) McDonnell S.M, Garcia M.C, Kenney R.M, (1986) Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 27: 187-191.
- 46) McDonnell S.M, Garcia M.C, Kenney R.M (1987) Pharmacological manipulation of sexual behaviour in stallions, *Journal of Reproduction and Fertility*. 35: 45-49.
- 47) Morel Davies M.C.G (2015) The reproductive anatomy of the stallion. En: Morel Davies M.C.G. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*, 4a ed. Malta Gutenberg p. 16-29.
- 48) Mrackova M, Blahova Z, Sedlinska M, (2013) The reliability of two different protocols for pharmacologically induced ejaculation in donkeys (*Equus asinus*), *Journal of Equine Veterinary Science* 33: 1121-1123.

- 49) Naoman UT, Ali AJ. (2012) Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically induced ejaculation in donkeys. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 26:81–3.
- 50) Pickett W.B, Vosst J.L, Squires E.L, (1977) Impotence and abnormal sexual behavior in the stallion, *Animal reproduction laboratory, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences* 8(6): 329-347. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X77901856>. Fecha de consulta: 16/10/15.
- 51) Rimbaud (2005) Fisiopatología de la reproducción. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Rimbaud2005h.pdf>. Fecha de consulta: 04/03/2016.
- 52) Rowley D.D, Lock T.F, Shipley, C.F (1999). Fertility of detomidineHCl induced ex copula ejaculated stallion semen. *American Association of Equine Practitioners* 45, 221–223.
- 53) Schumacher J, Varner D.D. (2011) Abnormalities of the accessory sex glands. En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E, Varner D.D, *Equine Reproduction*, 2a.ed. Ames. Blackwell. V 1 p. 1113-1118.
- 54) Schumacher J, Varner D.D. (2011) Abnormalities of the penis and prepuce. En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W. E, Varner D.D. *Equine Reproduction*, 2a. ed. Ames. Blackwell. V 1 p.1130-1141.
- 55) Segraves R.T, (1989), Effects of psychotropic drugs on human erection and ejaculation, *Archives of General Psychiatry* 46:275-284.
- 56) Serres C (2012), Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen, I Congreso Solidario de Clínica Equina, Madrid, España p.125-134.

- 57) Sghiri A, Tibary A, El Idrissi R. (2006) Behavioral response to imipramine/xylazine treatment in jackass. En: Bakkoury M, Dakkak A, editors. Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association. Marrakech, Morocco. p. 348–350.
- 58) Smith J.D (2007) Drugs in equine reproduction. North american veterinary conference, Mississippi, United States. Disponible en: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/LA/081.asp?LA=1>. Fecha de consulta: 20/09/2015.
- 59) Squires. E, Pickett. B (2011), Factors affecting sperm production and output. En: McKinnon, A.O, Squires, E.L, Vaala W. E, Varner, D.D. Equine Reproduction, 2a. ed. Ames, Blackwell. V 1, p 1344-1361.
- 60) Stout T.A.E (2005) Modulating reproductive activity in stallions. Animal Reproduction Science 89: 93-103.
- 61) Tischner M, Kosiniak K, Bielanski W (1974) Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. Journal of Reproduction and Fertility 41: 329-335.
- 62) Turner R, (2011) Abnormalities of the ejaculate. En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E, Varner D.D, Equine Reproduction, 2a.ed. Ames. Blackwell V 1 p.1119-1129.
- 63) Turner R, McDonnell S, Hawkins J, (1995) Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from stallion with fractured radius, Journal of the American Veterinary Medical Association 206(12):1096-1908.
- 64) Varner D.D (2011) From a sperm's eye view: Revisiting our perception of this intriguing cell En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E, Varner D.D, Equine Reproduction 2a.ed. Ames. Blackwell. V 1 p. 909-990.

- 65) Varner D.D (2011) The Ins and Outs of Sperm Management. Symposium of the American Association of Equine Practitioners. St.Michael, Barbados p.82-97.
- 66) VerVoort M.D, Shane M (1987) Ejaculatory Stimulation in spinal- cord injured men. From the department of physical medicine and rehabilitation, Nature Middle East, 29(3): 282-289. Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3548007>. Fecha de consulta 08/02/16.
- 67) Veeramachaneni R, (2011) Spermatozoal Morphology En: McKinnon A.O, Squires E.L, Vaala W.E, Varner D.D. Equine Reproduction. 2a.ed. Ames. Blackwell V 1 p. 1297-1307.
- 68) Waldinger M, Schweitzer D, (2005) Retarded ejaculation in men: an overview of psychological and neurobiological insights, World Journal of Urology 23 (2): 76-81.
- 69) Yonezawa A, Ryuichiro A, Watanabe C, Furuta S, Kutsuwa M, Sakurada S, Kimura Y, (2001) Alfa2-Adrenoreceptor antagonists: effects on ejaculation, penile erection and pelvic thrusting behavior in dogs, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 70: 141-147.