

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

DILUYENTES DE SEMEN EQUINO PARA SU USO FRESCO Y REFRIGERADO POR 24 Y 48 HORAS. COMPARACIÓN ENTRE LECHE DESCREMADA UHT Y UN DILUYENTE COMERCIAL (EQUIPRO™)

por

Cecilia DUTRA MUÑOZ

Florencia GRAGLIA GIMENEZ

María Noel MARTÍNEZ PEREIRA MACHADO

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

Montevideo
Uruguay
2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Fernando Perdigón

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Daniel Cavestany

Tercer Miembro:

Dr. Alejandro Bielli

Cuarto Miembro (Co-tutor):

Dr. Danilo Fila

Fecha:

6 de Marzo de 2013

Autores:

Cecilia Dutra Muñoz

Floencia Graglia Gimenez

María Noel Martínez Pereira Machado

AGRADECIMIENTOS

Dr. Daniel Cavestany

Dr. Danilo Fila

Dr. Nicolás Cazales

Esc. Mónica Pereira Machado

Sr. Numa Mangado

Y a nuestras familias

TABLA DE CONTENIDOS

TÍTULO	PÁGINA
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
Anatomía y fisiología reproductiva del padrillo.....	10
Espermiograma	15
Colecta de semen	19
Manejo del semen post extracción y almacenamiento.....	22
Equipro™ vs Leche descremada UHT.....	27
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Título	Página
Cuadro 1. Evaluación de los distintos aspectos de las etapas del proceso de monta y eyaculado de los tres padrillos utilizados en el estudio	35
Cuadro 2. Características del eyaculado, promedio del volumen, cantidad de gel, pH y motilidad del semen puro de cada padrillo	36
Cuadro 3. Anormalidades morfológicas del semen, según padrillo	42
Cuadro 4. Anormalidades morfológicas según el diluyente	42
Figura 1. Volumen de eyaculado y gel (mL) en cada colecta	37
Figura 2. Motilidad inicial del semen colectado, según el número de colectas	37
Figura 3. Motilidad promedio en función de cada observación. Entre cada observación existen intervalos de media hora	38
Figura 4. Motilidad promedio del semen de cada padrillo, fresco, a las 24 y a las 48 horas con respecto a la hora	39
Figura 5. Motilidad promedio del semen de los tres padrillos, fresco, a las 24 y a las 48 horas, en cada diluyente con respecto a la hora	41

RESUMEN

La mayoría de las sociedades criadoras de las distintas razas equinas aprueban el uso de la inseminación artificial y la producción se ha visto beneficiada con su uso. Estudios recientes en la tecnología del semen refrigerado han permitido reducir mayores impactos y así prolongar la viabilidad seminal. Una buena colecta y manejo del semen son claves en el mantenimiento de su calidad. Para poder refrigerar el semen, éste debe ser diluido. Por esta razón se evaluó su calidad previo a la dilución para posteriormente comparar la eficacia de la leche descremada UHT con un diluyente comercial en semen refrigerado. Para esto se utilizaron tres padrillos Cuarto de Milla definitivos de 9, 6 y 5 años de edad. Las muestras se colectaron con vagina artificial utilizando yeguas en celo previamente inducido con 2cc de Estradiol. El estudio seminal consistió en un espermiograma completo comparando calidad de eyaculado y las diluciones. Mediante un análisis estadístico se estudiaron los distintos aspectos de las etapas de monta, las características del eyaculado y el efecto de los diluyentes, obteniendo en líneas generales mejores resultados con el diluyente comercial. La leche descremada UHT arrojó muy buenos resultados sólo en las primeras 24 horas de refrigerado, por lo cual se concluyó que la elección de uno u otro diluyente dependerá del tiempo estimado entre la colección y la inseminación. A su vez, se debe considerar la relación costo beneficio teniendo en cuenta que la leche UHT es más económica y de más fácil acceso que los diluyentes comerciales.

SUMMARY

The majority of the equine breeders approve the use of artificial insemination and production has been benefited by its use. Recent studies on refrigerated semen technology have allowed to reduce major impacts and thus prolonging the seminal viability. A good collection and handling of semen are key factors in maintaining its quality. To be able to refrigerate semen, it should be diluted. For this reason, prior to dilution, semen quality was assessed to subsequently compare the effectiveness of low-fat UHT milk with a commercial extender for refrigerated semen (Equipro™). Three quarter horse stallions of 5, 6 and 9 years of age were used and samples were collected with artificial vagina using mares in heat previously induced by 2cc of Estradiol. The seminal evaluation consisted of a complete spermogram comparing quality of ejaculate and the effects of the dilutions. Different aspects of phases of mounting, the ejaculate characteristics and the effect of diluents, were analyzed, obtaining better results with the commercial extender. UHT skim milk showed very good results only in the first 24 hours, by which it was concluded that the choice of one or another extender will depend on time estimated between collection and insemination. At the same time it must be taken into account the cost-benefit, considering that UHT milk is more economical and of easier access than commercial extenders.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país en los últimos tiempos se ve un claro reflejo de la situación mundial en cuanto a las biotecnologías reproductivas con un aumento notable en el uso de la inseminación artificial. Consecuencia del aumento de la popularidad de la industria equina, por la mayor participación y éxito en los deportes ecuestres. Es por esto que las principales sociedades de criadores admiten y registran éstos productos, como ser la sociedad de criadores de caballos criollos (SCCC), árabes (SCCA), cuarto de milla (SCCM) entre otras.

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva efectiva en el aprovechamiento del macho superior. Consta de la colección de semen; seguido de su transferencia mediante instrumentos dentro del tracto reproductivo de la hembra sexualmente receptiva al momento de la ovulación, resultando en la fertilización del oocito.

La IA se puede realizar con semen fresco, refrigerado o congelado. En casos en que esta se posponga 12 horas después de la colecta, el semen debe ser refrigerado. Esto prolongará la longevidad al disminuir la tasa metabólica del espermatozoide reduciendo los requerimientos energéticos y nutritivos (Knottenbelt, 2003). La refrigeración se debe realizar de forma controlada y es por esto que existen dispositivos especialmente diseñados para dicha función como el Equitainer®, manteniéndolo a una temperatura de 5 °C durante 48 horas (Knottenbelt, 2003). La técnica de inseminación artificial consta de la colecta de semen y el posterior estudio de sus características (volumen, concentración, motilidad) y determinación de la dosis inseminante. Para realizar esto el semen se diluye con el fin de proveerle un ambiente adecuado para su supervivencia, aumentando su viabilidad. Las cualidades de un buen diluyente son que provea de un ambiente favorable al espermatozoide, de fácil preparación y almacenamiento, de bajo costo y que permita una evaluación del semen de forma precisa. Existen varios diluyentes comerciales en el mercado. La mayoría de los diluyentes de semen equino están basados ya sea en leche descremada o en yema de huevo (Douglas-Hamilton y col, 1984). En nuestro país el uso de la leche UHT descremada se ha extendido ampliamente. El fin de este estudio es determinar la efectividad de la leche UHT descremada como diluyente en se-

men de padrillo refrigerado al momento de la extracción, a las 24 y a las 48 horas. Es por esto que comparamos muestras de semen diluidas con la leche UHT descremada con un diluyente comercial ya probado, el Equipro™.

Se realizó un espermiograma completo y la prueba de termoresistencia. El espermiograma se define como el análisis macroscópico y microscópico del semen. A raíz del mismo obtenemos datos del volumen, aspecto y pH así como también datos sobre la concentración, motilidad, morfología y longevidad. La termoresistencia es un método grosero para evaluar la longevidad espermática; provee una estimación de la habilidad de los espermatozoides para sobrevivir en el útero de la yegua. En ambas pruebas se evaluaron las características seminales al momento de la extracción, a las 24 y a las 48 horas para su posterior comparación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Anatomía y fisiología reproductiva del padrillo

La anatomía reproductiva genital del padrillo incluye dos testículos, localizados en el escroto, y sus ductos asociados. Hay dos epidídimos y cordones espermáticos, dos deferentes y dos ampollas que vacían su contenido dentro de la uretra pélvica. Las glándulas accesorias son la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. Los genitales externos están compuestos por el pene y el prepucio (Dyce, 1999).

El escroto está formado por dos sacos que rodean cada uno de los testículos y están separados por un septum.

Los testículos son glándulas donde se produce no solo la espermatogénesis sino también hormonas como la testosterona y la dihidrotestosterona. Se ubican dentro del escroto debajo del borde craneal del pubis. En su conjunto tienen forma globular y asimétrica, irregularmente elipsoide, ligeramente comprimidos de lado a lado. Sus ejes longitudinales están en sentido horizontal. El testículo se compone de los túbulos seminíferos, los cuales contienen las células germinativas, las células de Sertoli que producen proteínas que facilitan la producción espermática y llevan nutrientes a las células espermáticas, entre otras funciones; el intersticio y las células de Leydig que se encuentran en el intersticio entre los túbulos y son las encargadas de producir la testosterona. Los túbulos seminíferos se vacían dentro de los túbulos rectos, quienes desembocan en la rete testis, la cual se continúa dentro de los túbulos eferentes y a continuación en el epidídimo.

El descenso testicular se produce al parto o poco después. Sin embargo, en algunos casos, este evento puede estar retrasado dos a seis meses después del nacimiento. Puede demorarse también hasta 6 a 24 meses de edad, aunque estos padrillos pueden considerarse criptorquidios. En estos casos el testículo se encuentra en el canal inguinal y le puede llevar más tiempo llegar al anillo inguinal externo y/o escroto. No está recomendado usar este tipo de padrillos como reproductores, debería realizarse la orquiectomía.

El epidídimo se sitúa a lo largo del borde dorsal y se proyecta un poco más allá de los polos testiculares. Es donde se produce la maduración y el almacenamiento espermático. Consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza (caput epididymis) es una extensión de los ductos eferentes, su forma es chata y se encuentra adherida al testículo en su parte caudal. Su función es la reabsorción del exceso de fluido asociado con la espermatogénesis. El cuerpo (corpus epididymis) es tubular y está poco adherido a la superficie dorsal del testículo. La cola (cauda epididymis) tiene forma de circular a ovoide y al igual que el cuerpo está poco adherida al testículo. Estas dos últimas producen secreciones importantes para la maduración de los espermatozoides. A su vez, la cola los almacena hasta que ocurre la eyaculación. El espermatozoide demora entre 8 a 11 días en atravesar la longitud del epidídimo, aunque este tiempo se puede reducir a 3 días durante la estación de monta. Del epidídimo, el esperma y sus fluidos asociados se vacían en el conducto deferente. Cada deferente posee una ampolla en su terminación, uniéndose con el ducto de la glándula vesicular respectiva para formar el ducto eyaculador, de pocos milímetros, que desemboca en la uretra.

El cordón espermático corre desde el anillo inguinal interno hasta la base de los testículos en el escroto. Consiste en la arteria, vena y nervio testiculares, el túbulo deferente y músculo cremaster. La arteria testicular es muy importante en la regulación de la temperatura de la sangre que entra y sale del testículo. La arteria y la vena testicular forman el plexo pampiniforme. El músculo cremaster, quien se encuentra en el aspecto lateral del cordón espermático, es quien sube o baja los testículos durante los cambios de temperatura y provee de soporte a los testículos en el escroto. Los testículos son mantenidos aproximadamente 4 a 6 °C menos que la temperatura corporal, para la máxima producción espermática (Leblanc, 2004).

Las glándulas vesiculares son pares y comprenden de sacos vesiculares, llenos de la fracción gelatinosa del eyaculado. Las glándulas bulbouretrales, también pares, producen secreciones para el mantenimiento de la longevidad espermática en el tracto genital de la hembra.

El pene del caballo es músculo-cavernoso. Presenta tres cuerpos eréctiles. Estos son, los pilares del pene, el cuerpo cavernoso y el cuerpo esponjoso. Los pilares se originan en el arco isquiático y se unen formando la segunda estructura eréctil, el cuerpo cavernoso. Este está dividido por un tabique mediano el cual se va desvaneciendo en su parte distal, presentado un surco ventral donde se aloja el último elemento, o cuerpo esponjoso. Este último, forma el glande, el cual se asemeja a un hongo. En la corona, su parte más ancha, se encuentra la protrusión de la uretra hacia una fosa. En reposo, el pene se encuentra en la cavidad prepucial. El prepucio equino presenta la característica de poseer un pliegue que permite un alargamiento mayor del pene durante la erección.

La anatomía reproductiva funcional del macho también incluye al Sistema Neuro-Endocrino Hipotalámico-Pituitario-Testicular.

El padrillo tiene comportamiento reproductivo estacional. Un aumento de las horas luz, lo cual significará una disminución en las horas de secreción de melatonina por la glándula pineal, estimula al hipotálamo a secretar hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Ésta es secretada de manera pulsátil y actúa sobre la pituitaria anterior. Es aquí donde las células gonadotrópicas sintetizan y secretan las gonadotropinas, la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). De manera individual, los gonadotropos tienen la habilidad de secretar FSH, LH o ambas, la liberación de FSH y LH dependen del patrón pulsátil de GnRH. La secreción irregular de pulsos de baja amplitud de GnRH da lugar a la liberación de FSH, mientras que los pulsos secretores de alta frecuencia de GnRH inducen la liberación de LH (Cunningham, 1999).

Las células de Leydig convierten el colesterol en testosterona por la estimulación de la LH. Ésta no solo se dirige hacia la circulación general sino también a los testículos, donde es necesaria para la espermatogénesis. La testosterona tiene feedback positivo y negativo sobre la hipófisis y el hipotálamo. Parte de la misma, es convertida en estrógenos por las células de Leydig y otra parte por el hipotálamo y la hipófisis. Las células de Leydig también secretan oxitocina, la cual actúa a nivel de los túbulos seminíferos estimulando su contracción y promueve el transporte de las células germinales a lo largo de los túbulos.

La hormona folículo estimulante actúa sobre las células de Sertoli induciendo la liberación de inhibina, activina y proteína fijadora de andrógeno. La FSH no es completamente dependiente de la GnRH en el macho. La inhibina y la activina también inhiben y promueven respectivamente la liberación de la hormona folículo estimulante. La proteína fijadora de andrógenos se une a la testosterona y a la dihidrotestosterona para provocar las altas concentraciones logradas a nivel testicular en las células germinales.

La espermatogénesis es el proceso de maduración de las células germinales testiculares (espermatogonias) a espermatozoides. Este proceso requiere de divisiones mitóticas y meióticas de las células germinales. Cuando el macho llega a la pubertad, donde hay una activación del eje hormonal y una activación de la testosterona, aumenta el número de espermatogonias y comienza la primera ola espermatogénica.

La pubertad se define como el comienzo de la función reproductiva exitosa. En el potrillo, la pubertad por lo general se alcanza a los 18 meses promedio, donde comienzan a mostrar un comportamiento típico masculino. La libido empieza a mejorar un año después de que el animal presenta la pubertad. A los 9 meses de edad, las concentraciones de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) comienzan a incrementar en circulación. A los 12 meses de edad, los testículos empiezan a aumentar de tamaño, 1 mm por semana desde los 12 hasta los 18 meses (Knottenbelt, 2003).

La espermatogénesis ocurre en ciclos u ondas dentro de los túbulos seminíferos. Dependiendo de la localización en que se encuentre del túbulo seminífero, podemos encontrar diferentes estadios del ciclo. La espermatogénesis se completa a los 57 días promedio, desde la forma de espermatogonia a la forma de espermatozoide maduro. Por lo general la espermatogénesis se divide en tres etapas principales, la espermatocitogénesis (mitosis y diferenciación de espermatogonias), la meiosis (multiplicación de espermatocitos primarios, dando origen a espermatidas) y la espermiogénesis (diferenciación de espermatidas redondas a espermatidas largas). A estas espermatidas se les llama espermatozoides una vez que son liberadas del epitelio seminífero dentro del lumen tubular. Los eventos principales de la espermatogénesis son la formación del acro-

soma a partir del complejo de Golgi, la condensación y elongación del núcleo, la formación del flagelo y el desecho de una cantidad abundante de citoplasma. La cabeza del espermatozoide contiene el material genético. Recubriendo la cabeza se encuentra el acrosoma conteniendo enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración del oocito. La parte media contiene las mitocondrias, que proveen la energía para producir el movimiento de la cola.

La producción espermática diaria es de 3,2 a 6,6 mil millones de espermatozoides. Ésta disminuye un 20% en los padrillos maduros fuera de la estación reproductiva. A su vez, puede llegar a disminuir hasta un 35% en padrillos geriátricos o de más de 13 años de edad. Padrillos menores de 6 años no solo producen menor volumen total sino también menor volumen de fracción sin gel y menor número de espermatozoides por eyaculado que padrillos maduros. A los 6 años se completa la maduración del padrillo por lo que no encontraremos diferencias entre éstos y uno de mayor edad. En contraste, la eficiencia de la producción espermática aumenta en un 50% durante la estación de monta y tiene un sostenido aumento desde la etapa postpuberal a la de padrillo maduro junto con el tamaño testicular. El tamaño testicular está altamente correlacionado con la producción espermática diaria. Ofrece información valiosa al técnico ya que se puede estimar la producción espermática. Padrillos que presenten un ancho escrotal menor a 80 mm no deberían ser usados en programas de monta ya que sus testículos serán considerados hipoplásicos. El 40% de la variación del tamaño testicular se debe a la diferencia de edad. Aunque el tamaño testicular es un factor importante, es necesario que el tejido testicular sea normal. La consistencia testicular debe ser semejante a una pelota de tenis, cualquier cambio en esta puede llegar a ser una causa potencial en la disminución de la producción espermática.

La frecuencia de eyaculación afecta al volumen total y al número de espermatozoides por eyaculado hasta que se alcance la producción espermática diaria, es decir que cuanto más frecuente se colecte el semen menor será el volumen. La producción espermática diaria se refiere al total de espermatozoides que un padrillo puede eyacular por día, tras haber provocado la depleción de las reservas espermáticas extra gonadales. Estas reservas están primariamente en la cola del epidídimo y pueden ser de 3 a 4 veces el valor actual de la producción

espermática diaria. Por lo tanto, debemos reducir estas reservas previo a la evaluación de la fertilidad del padrillo ya que el número de espermatozoides colectados no sería representativos (Youngquist, 1997). La producción espermática diaria se determina tras 5 a 7 días de sucesivas colectas. Teniendo esta información el propietario puede saber cuántas yeguas podrá cubrir o inseminar su padrillo por día.

Espermiograma

Se define como el análisis macroscópico y microscópico del semen. A raíz del mismo se obtienen datos del volumen, aspecto y pH así como también datos sobre la concentración, motilidad, morfología y longevidad. El objetivo de este estudio es determinar si el semen del padrillo es apto para preñar.

Para realizar una correcta evaluación del semen se debe hacer de manera metódica, por una persona con experiencia y en condiciones de laboratorio adecuadas. En una primera instancia se deberá separar la fracción gel del eyaculado. Esta fracción contiene un bajo número de espermatozoides que generalmente se encuentran muertos y es la última porción del eyaculado. Este proceso de separación se puede realizar mediante aspiración con una jeringa estéril, una cuidadosa decantación o por medio de la filtración, ya sea a través de una gasa o con un sistema incorporado a la vagina artificial. Una vez extraída la porción gel, se mide el volumen teniendo éste poca relación con la determinación de la fertilidad (Blanchard, 2003). Igualmente, la correcta determinación del volumen es esencial para el cálculo del total de espermatozoides. Normalmente la producción seminal del padrillo es de 70 mL aproximadamente. Sin embargo, varía considerablemente pudiendo ser desde 30 a 250 mL (Davies Morel, 2005). A su vez, se evalúa el aspecto el cual es normalmente de color blanco lechoso, no evidenciando manchas de sangre, contaminación con orina o coágulos. Un pH seminal aceptable es de 7,2 a 7,7. Los pH ácidos tienen un efecto espermicida, por el contrario los pH alcalinos pueden indicar la presencia de material extraño o infección.

La concentración espermática es muy importante para la valoración del semen. Para la determinación de la concentración de una muestra espermática debemos tomar un volumen predeterminado de semen puro y mezclarlo con un volumen predeterminado de diluyente. Esto puede ser llevado a cabo usando un hematocitómetro (cámara de Neubauer), espectrofotómetro, densitómetro o un método computarizado. El hematocitómetro consta de un portaobjetos para contar células con un cubre bajo el cual se coloca un determinado volumen de semen diluido y se observa al microscopio. A partir del número de espermatozoides contados y el factor de dilución se puede calcular la concentración espermática. Tiene como ventaja ser barato y el único método que cuenta los espermatozoides directamente ya que el espectrofotómetro y el densitómetro evalúan la opacidad del fluido, por ende tienen el potencial de dar valores mayores de lo normal debido a la presencia de material no espermático. Como desventajas, el hematocitómetro consume mayor tiempo y se producen mayores errores debidos a la dilución y al pipeteado. La concentración espermática en el semen equino tiene valores de $30-600 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro de semen. Se necesitan 100×10^6 espermatozoides por mililitro para obtener una buena fertilización (Davies, 2005).

Para realizar la evaluación microscópica se debe observar la motilidad del semen puro y posteriormente diluir la muestra para poder observar con mayor detalle los espermatozoides individualmente, ya que tienen tendencia a agregarse (Knottenbelt y col., 2003). La motilidad total se expresa en porcentaje de espermatozoides moviéndose en un campo microscópico en el centro del preparado. Esta valoración es un tanto subjetiva ya que depende del observador. Por esto es que existen métodos automatizados como el CASA (Computer Assisted Semen Analysis) los cuales involucran una cámara de video conectada a un microscopio de contraste de fase y a una computadora que digitaliza las imágenes del tamaño y de los movimientos espermáticos. Estas imágenes, permiten analizar la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral. El movimiento de dichos espermatozoides debe ser progresivo, siendo los movimientos oscilatorios o en círculos anormales. Un semen con una motilidad activa y progresiva del 40% puede considerarse adecuado para la inseminación artificial (ColenBrander y col., 1992; Ricketts, 1993; Davies Morel,

1999). No obstante, la correlación entre motilidad y fertilidad es variable y baja (0,7) (Pickett y col., 1975; Samper y col., 1991; Jasko y col., 1992; Heitland y col., 1996). Algunos factores extrínsecos que afectan la motilidad inicial serán magnificados cuando se evalúe la longevidad. Por lo tanto, algunos de estos factores no son detectados si sólo se evalúa la motilidad inicial, pero pueden ser obvios cuando el semen es evaluado a lo largo del tiempo.

La termorresistencia es un método grosero para evaluar la longevidad espermática. Provee una estimación de la habilidad de los espermatozoides para sobrevivir en el útero de la yegua. Es una prueba sencilla, de bajo costo, fácilmente reproducible donde se estudian las variaciones en la motilidad espermática. Consiste en someter a alícuotas del semen diluido y refrigerado a baño maría a una temperatura similar a la corporal (37 °C). Se realiza una evaluación de la motilidad inicial y luego al cabo de varios intervalos. Esto se hace colocando una gota del semen diluido sobre un portaobjetos a 37 °C con un cubreobjetos y se observa al microscopio óptico.

La motilidad debe de ser evaluada hasta que cae por debajo de un 25%. El tiempo que transcurrió hasta que la motilidad alcanza dicho valor, debe ser registrado. El semen refrigerado, no debería de almacenarse por más tiempo del que fue registrado, ya que no sería de utilidad para la inseminación artificial.

Bajo condiciones naturales la regulación de la motilidad espermática ocurre en tres puntos críticos. La reserva epididimal (cauda epididimal y el ducto deferente) – supresión de la motilidad; eyaculación- activación de la motilidad; reserva oviductal- hiperactivación de la motilidad. La migración espermática al oviducto es dependiente en gran parte de las contracciones uterinas. El tiempo requerido para que los espermatozoides tengan acceso al oviducto no ha sido estudiado extensivamente. Se han detectado los espermatozoides en el oviducto a las 2 horas post inseminación. El número suficiente de espermatozoides para establecer una preñez puede ser transportado dentro del oviducto 30 minutos post inseminación. Las tasas de preñez son maximizadas retrasando el lavaje uterino hasta 4 horas post inseminación (Dickson y col, 2011).

Las guías para la evaluación del semen de prospectos de padrillos elaboradas por la Sociedad de Teriogenología de EEUU recomiendan que semen manteni-

do a temperatura ambiente debería de conservar el 10% de su motilidad progresiva a las 6 y a las 24 horas para semen puro y diluido respectivamente (Schumacher y Moll, 2011).

En general, el número de espermatozoides y la motilidad progresiva son las dos principales causas de infertilidad en padrillos (Gordon, 1997). La oligospermia es considerada la mayor causa de infertilidad en padrillos y está asociada a degeneración testicular causada por procesos patológicos (orquitis, epididimitis) o cambios seniles en padrillos viejos.

Para el examen morfológico, método muy utilizado para evaluar la fertilidad del padriño, se examinan los espermatozoides de una muestra diluida. Se observan individualmente y se toma nota del porcentaje de espermatozoides anormales en la muestra. Si un espermatozoide individual tiene más de una anomalía deberían ser registradas; sin embargo solo un espermatozoide debe ser contado como parte del total de espermatozoides contabilizados.

Para mejorar la visualización de la morfología espermática, se cuentan con distintas tinciones, como son la Eosina-Nigrosina la cual tiñe las cabezas de los espermatozoides muertos de violeta, tinciones del acrosoma, test de inmunofluorescencia y marcado con anticuerpos monoclonales.

Las anomalías se clasifican en primarias, fallo en la espermatogénesis o maduración del espermatozoide, secundarias, daños producidos durante la eyaculación y terciarias, en casos de manipulaciones inadecuadas después de la eyaculación. Los primeros fallos suelen estar caracterizados por espermatozoides con dos cabezas, dos colas, sin pieza intermedia o sin cola, colas rudimentarias o colas excesivamente enroscadas, indicando problemas a largo plazo o incluso permanentes. Los daños en la maduración suelen verse representados por la presencia de gotas citoplasmáticas en la pieza intermedia del espermatozoide. Dicha gota corre hacia el final de la cola, desapareciendo hacia el final de la maduración. Por lo general representan un problema transitorio que se soluciona con un periodo de descanso. Finalmente, pérdidas del acrosoma, zonas intermedias deshilachadas o engrosadas y explosión de cabeza son debidas a daños después del eyaculado así como también colas enrolladas y piezas intermedias dobladas por shock térmico. Se ha evidenciado que en la

especie equina, el shock por frío ocurre entre los 19 °C y 8 °C. No se entiende este mecanismo lo suficientemente bien pero se sabe que está involucrada la membrana porque cuando la temperatura disminuye hay una pérdida de fosfolípidos (Batellier y col., 2001).

La teratospermia se define como un eyaculado con más de 40% de anomalías morfológicas. Dentro de sus causas, las más comunes son degeneración testicular, enfermedades epididimales y otros problemas de salud general del padrillo.

La presencia de anomalías morfológicas en cuanto a su papel en la fertilidad, sigue siendo un tema en discusión. La alta incidencia de una anomalía podría no ser tan crítica para la fertilidad como la presencia de múltiples anomalías (Tibary; Rodríguez, 2011). El semen que contiene un 65% o más espermatozoides morfológicamente normales, se considera apropiado para la inseminación artificial (Fayrer-Hosken y Caudle, 1989; Pickett, 1993; Davies Morel, 1999).

Colecta de semen

Para la obtención de la muestra de semen se puede optar por varios métodos. El más fácil pero menos fiable por su variabilidad en calidad es la recogida de muestras al desmontar. Esto se hace colocando el semen que gotea del padrillo en un recipiente estéril después de haber retirado la yegua. Este tipo de muestras suelen tener bajas concentraciones de espermatozoides y una alta carga bacteriana. Otro método también sencillo pero poco utilizado es la extracción del semen de la vagina anterior inmediatamente post cópula. En este caso el semen ha tomado contacto con las secreciones ácidas vaginales espermicidas. A través de ninguno de los dos métodos mencionados anteriormente podemos evaluar correctamente las características seminales.

A su vez, se han desarrollado dispositivos similares a condones. Hay opiniones controversiales sobre su uso ya que para algunos funcionan muy bien y para otros tienden a romperse y desprenderse fácilmente.

Otro método menos utilizado es la colección por estimulación química, con Xilacina y/o Imipramina junto con estimulación manual, resultando normalmente en un eyaculado muy concentrado de poco volumen. Esto es de gran utilidad para padrillos con problemas músculo esquelético o físicos que impidan la monta.

Finalmente el método más utilizado en la actualidad es la vagina artificial (VA). En las últimas décadas se ha trabajado y mejorado en el diseño de la VA, lo que ha simplificado el proceso de colecta. Existen varios modelos disponibles tales como el Cambridge, Colorado, Missouri, Nishikawa y Hannover, todos ellos con el mismo diseño general. Este consiste en una cubierta sólida exterior tubular, una interna usualmente de látex entre las cuales hay una camisa donde se coloca el agua por medio de una válvula o un tapón. Este sistema de colección está diseñado para que el semen contacte lo menos posible con la envoltura interna de látex ya que los materiales de goma son tóxicos para los espermatozoides. Colborn y col. (1990) demostraron que el semen colectado con vaginas revestidas con polietileno presenta una mayor motilidad que los colectados con vaginas revestidas de goma.

La VA debe ser preparada inmediatamente antes de la colección de semen. Se llena con agua caliente entre 48 y 50 °C para proveer una temperatura interna ligeramente superior a la corporal (44 a 48 °C). La temperatura de la VA debería de estar por encima de los 6 a 8 °C de la corporal, lo que parece estimular la copulación sin dañar los espermatozoides (Knottembelt y col., 2003). Si la temperatura es demasiado baja el esperma sufre un shock térmico y muere, si está demasiado caliente tiene un efecto perjudicial, corriendo el riesgo de que el padriño no quiera volver a utilizar la VA e incluso realizar un servicio natural. La cantidad de agua debe ser la adecuada para que la presión interior de la VA sea lo más parecido posible a lo que experimenta el pene dentro de la vagina natural. Modelos como el Missouri permiten incrementar la presión de la luz inflando el compartimento del agua con aire minimizando el peso final de la VA. La envoltura interna suele estar cubierta por otra envoltura adicional desechable estéril, útil en el caso de extracción de varios padrillos, eliminando así cualquier chance de contaminación cruzada, ya sea bacteriana o seminal.

Antes de la colección la superficie interna de la vagina artificial debe ser lubricada con un lubricante que no sea espermicida. Se coloca un filtro de semen en el recipiente adherido al final de la VA para filtrar la porción gel.

Es de suma importancia que el personal involucrado sea consciente de los procedimientos a realizar ya que son maniobras peligrosas para el operador. El lado donde se realice la colecta, no afectará el eyaculado, pero una vez que el padrillo se haya acostumbrado de uno de los lados es conveniente continuar de la misma forma en el futuro.

El padrillo debe ser estimulado con una hembra con comportamiento estral para la erección. Una vez erecto el pene es necesario su inspección en busca de lesiones y lavado con agua tibia para minimizar la contaminación del eyaculado con bacterias, suciedad y restos epiteliales de la superficie del pene. Se debe tener especial cuidado en el lavado de la fosa uretral. El pene es rutinariamente lavado solamente con agua tibia ya que lavajes repetidos con jabón, remueven la flora bacteriana normal permitiendo el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos. Después del lavado el pene debe ser secado con toallas de papel ya que el agua es espermicida.

Para la monta se puede utilizar tanto una hembra en estro como una hembra en anestro con un tratamiento hormonal con estradiol, lo cual induce estro sin ovulación (estro no fisiológico o inducido). Alternativamente, el padrillo puede montar un maniquí. En el caso de la hembra, debe de estar mostrando un buen comportamiento estral y encontrarse receptiva al padrillo. Es conveniente que sea tranquila, debe ser maneada, su cola vendada y atada hacia el lado opuesto a la colecta. El perineo debe ser lavado evitando dejar residuos de jabón y secado con papel toalla. La mayoría de los padrillos suelen utilizar los maniqués sin problemas. Sin embargo, otros no se muestran dispuestos, normalmente como resultado de una pobre libido.

Una vez que el padrillo monta la yegua o el maniquí, su pene debe ser desviado e introducido en la VA. Esta maniobra debe ser realizada lo antes posible, tratando de que un 50% o más sea insertado y mantenido dentro de la VA. Si esto no ocurre el glande se dilata, siendo demasiado grande para permitir la penetración completa en la VA y resultando en una falla eyaculatoria por una

inadecuada estimulación peneana. Para realizar una adecuada estimulación es importante que el glande sienta presión en el fondo de la vagina.

Estando el pene dentro de la VA, el recipiente de colección debe ser mantenido paralelo al piso o ligeramente hacia abajo para asegurar el flujo libre del eyaculado dentro del recipiente. La VA debe ser mantenida en un ángulo que le sea apropiado al padrillo. Una mano del colector es usada para sostener la VA mientras que la otra es colocada con el dedo pulgar dorsal y los cuatro dedos restantes ventrales a la base del pene y así palpar los flujos eyaculatorios que son de 3 a 5 por eyaculación. Otros signos de eyaculación que pueden estar presentes o no, son el “zapateo” cuando el padrillo retira y apoya alternadamente los miembros posteriores, “movimientos de bandera” de cola hacia dorsal y ventral. La eyaculación usualmente ocurre luego de 4 a 5 empujes. A medida que el pene se relaja, la mano sobre el pene se usa para quitar el semen restante.

El agua dentro de la VA se debe de extraer inmediatamente luego de la eyaculación para permitir que el semen fluya dentro del recipiente de colección. Es necesario proteger la colecta de los rayos UV. Para esto debemos tener la precaución de no exponerla a la luz solar directa.

En el caso de que los padrillos no realicen los empujes eyaculatorios, puede ser necesario para el colector cambiar la presión o la temperatura dentro de la vagina. Compresas de agua tibia o la presión misma de la mano del colector en la base del pene pueden ayudar a la estimulación de la eyaculación.

Manejo del semen post extracción y almacenamiento

Durante la colección de semen y su posterior transporte al laboratorio, la muestra debe ser mantenida a una temperatura de 37 °C hasta su evaluación. Es por esto que todo el instrumental que tenga contacto con el semen, deberá estar calentado a la temperatura mencionada anteriormente. Es conveniente usar microscopios con platina térmica, así como también calentar los porta y cubreobjetos y pipetas para evitar el shock de frío.

Aire, luz ultravioleta, agua, sangre y/u orina son considerados espermicidas, por consiguiente no deberían tener contacto con nuestra muestra.

El plasma seminal juega un papel importante. Una concentración muy alta tiene efecto deletéreo en semen almacenado refrigerado; se ha reportado que la centrifugación y la remoción parcial del plasma seminal (dejando un 12%) previo al almacenamiento a 5 °C por 24-48 h, resultó en un aumento de la motilidad en semen de padrillos cuyas características mótilas eran ampliamente menores mediante el procesamiento convencional (Rigby y col., 2001). Por otro lado, la eliminación total de éste produce una marcada disminución de la motilidad, sugiriendo que una pequeña concentración de plasma seminal o sustituto de éste es esencial para la mantención de la motilidad espermática. En conclusión, la concentración del plasma seminal en semen diluido debe ser menor al 20%.

Idealmente el semen debería ser diluido dentro de los 3 minutos post colección. Se deberá colocar la muestra en un diluyente precalentado a 37 °C a base de leche con una dilución de 1:2 o 1:4. A mayor factor de dilución mayor supervivencia de los espermatozoides (Varner y col, 1991). La tasa mínima de dilución recomendada es de 1:1 siempre y cuando el semen se use dentro de las 2 a 4 horas posteriores a la extracción, en donde se debe usar una mayor dilución.

La razón por la cual se diluye el semen es que se provee a los espermatozoides de nutrientes o sustratos metabolizables que aumentan su longevidad ya que les aportan energía, especialmente si están en condiciones ambientales desfavorables en las cuales no sobreviviría en su forma pura. Los diluyentes a su vez aumentan la viabilidad del semen de padrillos sub fértiles así como también aumentan el volumen inseminante en programas de inseminación en los cuales se requieren unos pocos mililitros de semen puro. Los diluyentes también son usados gracias a que contienen antibióticos los cuales previenen el crecimiento bacteriano y por ende su transmisión. Las cualidades de un buen diluyente son que provea de un ambiente favorable al espermatozoide, de fácil preparación y almacenamiento, de bajo costo y que nos permita una evaluación del semen de forma precisa. La mayoría de los diluyentes de semen equino están basados ya sea en leche descremada o en yema de huevo (Douglas-

Hamilton y col, 1984). Los más comúnmente usados están basados en leche descremada desecada en polvo. Las lipoproteínas presentes tanto en leche como en yema de huevo protegen al espermatozoide del shock térmico al estabilizar las membranas celulares.

Algunos diluyentes contienen antibióticos como polimixina B, amikacina, amikacina y penicilina y ticarcilina; siendo los más usados el sulfato de amikacina (1mg/mL) y la penicilina potásica (1000 UI/mL). El uso de la gentamicina, por su mayor daño a los espermatozoides en comparación con los anteriores ha ido disminuyendo. El tipo de antibiótico puede afectar la motilidad espermática, como se ha demostrado mediante estudios en los cuales la gentamicina sobre cierta concentración disminuye la motilidad. Sin embargo, en un estudio reciente los diluyentes usando gentamicina resultaron mejores en la retención de la motilidad espermática que otros diluyentes. Evidentemente, el nivel de gentamicina usado en estos diluyentes no fue detrimental en la motilidad espermática (LeFrappier y col, 2010). Se ha intentado usar plasma y calostro como diluyente ya que ambos tienen grandes cantidades de inmunoglobulinas pero no han dado resultados satisfactorios. La decisión sobre cuál diluyente utilizar depende de las características seminales individuales de cada padrillo dependiendo de las diferencias en constituyentes específicos del diluyente.

Si se utiliza el semen fresco se deberá colocar en una incubadora a 37 °C debiendo utilizarse en las próximas 12 horas.

Recientemente ha habido un aumento constante en el uso de semen refrigerado en América Latina. Este aumento se debe a que en la actualidad existen métodos efectivos de refrigeración y la aceptación de distintas tecnologías de la reproducción por numerosas razas. El uso de semen refrigerado frente a la monta natural cuenta con varias ventajas como ser que permite evaluar la calidad seminal y el número de espermatozoides utilizados en una dosis de inseminación; la abolición de las restricciones geográficas, pudiendo acceder a semen de mayor calidad fácilmente; minimización de la transmisión de enfermedades tanto venéreas como sistémicas; la posibilidad de utilizar padrillos con lesiones físicas, problemas psicológicos, que no le permitan la monta natural; un mayor número de yeguas pueden ser servidas por eyaculado logrando un mejor apro-

vechamiento del padrillo. En la yegua los beneficios están dados por ser innecesario su transporte para la cubrición, disminuyendo los riesgos asociados; la posibilidad de preñar yeguas con enfermedades crónicas, anormalidades esqueléticas, problemas comportamentales, yeguas con endometritis post-servicio, en quienes no se recomienda la monta natural. Sin embargo, el uso de semen refrigerado también tiene sus desventajas. Dentro de estas se encuentran que tiene corta longevidad (24 a 48 horas); la fertilidad se ve reducida en caso de semen de padrillos poco resistentes a la refrigeración; alta susceptibilidad de los espermatozoides a daños ambientales por lo que se debe de tener una alta demanda técnica.

En cuanto al semen congelado, requiere técnicos más especializados que para el semen refrigerado para poder hacer uso del mismo. Esta tecnología frente a la anterior resulta en una menor fertilidad, además de que los costos de transporte son mayores. A su vez como el semen congelado tiene una menor longevidad en el tracto reproductivo de la hembra, se requiere una mayor sincronía entre la inseminación y la ovulación; por lo tanto mayores costos son necesarios por la revisión periódica de la yegua en el seguimiento folicular. En contraste, el transporte de semen congelado ofrece a los criadores beneficios adicionales que no son disponibles con el semen refrigerado. Algunas de estas son, los padrillos no tienen que estar disponibles siempre que haya demanda, más que nada en la estación de monta; enfermedad o muerte del padrillo no impiden la inseminación de yeguas con su semen; tiene mayor facilidad en cuanto a los tiempos de transporte ya que puede ser almacenado en el establecimiento hasta el momento de la inseminación; permite el envío del semen a países extranjeros; hay un mayor aprovechamiento ya que el semen colectado para congelarse es procesado resultando en un promedio de 10 a 12 dosis promedio por eyaculado. En cambio, con semen refrigerado generalmente se realiza la colecta para 1 o 2 yeguas, se inseminan y el sobrenadante se descarta.

En términos generales se entiende que las tasas de concepción con semen refrigerado son mayores que con semen congelado (Metcalf, 2005). Samper y col. (2002) obtuvieron en un estudio donde 876 yeguas fueron inseminadas con semen congelado de 106 padrillos, un 53,5% de preñez por ciclo. En cambio,

Heiskanen y col. (1994) reportaron un 87% de preñez por ciclo en un estudio realizado donde se inseminaron 26 yeguas con semen refrigerado de 3 padriillos por 40 horas.

La dilución, centrifugación y subsecuente remoción del plasma seminal en el semen para congelación no producen daños mayores, sin embargo el mayor daño ocurre durante el proceso de congelado y descongelado (Gordon, 1997). Ellington y col. (2000), demostraron que el descongelado del semen produce que los espermatozoides no se unan normalmente al epitelio del oviducto, lo que trae una disminución en la habilidad de la hembra para establecer reservas espermáticas en su tracto reproductivo. Estas reservas aseguran que haya espermatozoides viables presentes en el oviducto al momento de la ovulación cuando la inseminación precede a la ovulación.

El semen refrigerado prolonga la longevidad espermática ya que disminuye la tasa metabólica de los mismos, reduciendo los requerimientos energéticos y nutrientes. Cuando el semen es llevado a la temperatura normal (37 °C) la tasa metabólica retoma su normalidad así como también la motilidad y la fertilidad. Para maximizar la viabilidad y la motilidad espermática, el refrigerado del semen debería de ser a una tasa controlada. El enfriado muy rápido resulta en daños de la membrana espermática, con la pérdida de lípidos, iones y otras sustancias, resultando en una disminución de la motilidad y depresión del metabolismo celular. Estos cambios son irreversibles y son comúnmente conocidos como el shock de frío. La técnica se debe realizar mediante un enfriamiento rápido (de 0,5-0,3 °C/minuto) desde los 37 °C hasta los 20 °C. Después de que se alcanza esta temperatura, debe ser más lento (<0,1°C/minuto) hasta los 5 °C. La zona crítica de enfriado para el semen equino es entre los 19 °C y 8 °C (Battellier y col, 2001).

Existen varios métodos a partir de los cuales se puede refrigerar el semen. Uno de ellos es un contenedor designado especialmente para el transporte de semen refrigerado y es quien provee el proceso de refrigerado incremental más controlado, el Equitainer®. Este es un método que es recomendado y confiable. Otra opción es usar cajas de espumaplast con refrigerantes. En este caso el

semen es refrigerado a un gradiente más abrupto que en el Equitainer®. Una vez que almacenamos el semen en la caja no debería de ser retirado por varias horas. Como último método de refrigeración tenemos la colocación directa en un refrigerador. Si se utiliza este último método es aconsejable el uso de un buffer para retardar el proceso de enfriado.

Equipro™ vs Leche descremada UHT

Numerosos diluyentes han sido formulados para su uso con semen refrigerado de padrillo. La mayor parte de ellos mantiene una motilidad espermática aceptable por 24 horas pero tiempos mayores a este resultan en una motilidad decreciente. La mayoría de estos diluyentes se basan en la fórmula documentada por Kenney en 1975 basada en leche descremada en polvo y glucosa. En el presente trabajo mencionaremos solo las características del Equipro™ y la leche UHT para su comparación, dejando de lado otros diluyentes presentes en el mercado mundial y probados como Botu-Semen®, INRA96®, EZ Mixin entre otros.

En la década de los 80 se comenzó a utilizar leche fresca descremada para la preservación de semen refrigerado equino. Esta presentaba la desventaja que había que inactivar la lactenina, componente de la leche tóxico para los espermatozoides equinos. Esto se hacía calentando la leche a una temperatura de 92 a 95 °C durante 10 minutos. Con la aparición de la leche ultra pasteurizada (UHT) este inconveniente ha sido superado por las altas temperaturas a las cuales se somete durante el proceso de elaboración. Esto permite su utilización como diluyente directamente de la caja sin previo tratamiento ni refrigeración, manteniéndose estéril hasta su apertura. El efecto protector está dado por las micelas de caseína presentes en la leche. Boeta y col. (2000), obtuvieron resultados más favorables utilizando como diluyente la leche descremada UHT que el diluyente de Kenney. Los resultados arrojados por el estudio de Boeta y col. (2000) sugieren que la leche descremada UHT puede ser utilizada para la dilución de semen equino con resultados similares o mejores a los obtenidos con diluyentes químicamente definidos. A pesar de esto, se necesita realizar más trabajos sobre la leche descremada UHT como diluyente para confirmar la apa-

rente bondad de la utilización de la leche descremada UHT comercial (Boeta y col., 2000).

Un problema mayor de los diluyentes como leche descremada o yema de huevo es el factor que estos, como toda sustancia biológica, pueden diferir en sus composiciones químicas. Es decir que no tienen una composición constante en un 100%. Por lo tanto, se han desarrollado diluyentes con una composición más definida. En un estudio reciente (Pagl y col., 2006), un diluyente conteniendo una fracción definida de caseinatos, proteínas de suero de leche y una amplia gama de azúcares fue superior a la leche descremada (Equipro™; Minitübe, Tiefenbach, Alemania). Éste contiene la fracción de caseínas altamente purificadas derivadas de la leche, una mezcla de glucosa, sucrosa y leche descremada con una gama de antibióticos, como gentamicina, amikacina, penicilina y ticarcilina. El pH es de $7,0 \pm 0,3$ y la osmolalidad es de 315 ± 10 Osm/kg. Se encuentra disponible en medio líquido y en polvo. La primera es la forma que se utilizó en este estudio, siendo una solución estéril blanco lechosa. Este medio tiene como único requerimiento el precalentamiento a 38 °C previo a su uso. La temperatura del semen y del diluyente debe estar a la misma temperatura al momento de la dilución ± 1 °C.

En un estudio realizado por LeFrappier y col. (2010), donde se compararon varios diluyentes para el almacenamiento de semen de padrillo refrigerado por 72 horas, se constató que el Equipro™ fue superior frente a otros diluyentes como ser el EZ Mixin e INRA96® presentando mejores resultados en cuanto a motilidad. Por otra parte el Equipro™ preserva la calidad del semen de padrillo refrigerado en lo referido a motilidad, velocidad e integridad de membrana hasta el mismo punto o incluso mejor que la leche descremada como diluyente (Pagl y col., 2006). Según LeFrappier y col. (2012), diluyentes con fracción de caseinato definida presentan una mayor motilidad por más de 24 horas cuando son comparados con diluyentes basados en leche descremada en polvo en la cual no es tan definida en su composición.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: No existen diferencias entre la leche UHT descremada y el Equipro™ para su utilización como diluyentes para inseminación en fresco, a las 24 y 48 horas.

Objetivo:

- Comparar la eficacia de la leche descremada UHT con un diluyente comercial (Equipro™) para su uso en semen equino al momento de la extracción y refrigerado a las 24 y 48 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en el establecimiento “Santa Mónica”, ubicado en el departamento de Salto, paraje Paso Potrero de Arerunguá, km 121,5 de la Ruta Nacional 31, sobre suelo de basalto superficial y profundo.

El experimento consistió en comparar la eficacia como diluyente de semen equino fresco y refrigerado, la leche UHT, con un diluyente comercial (Equi-Pro®, mezcla de glucosa, sacarosa, leche descremada deshidratada y una selección de antibióticos), a las 24 y 48 horas.

El trabajo de campo se realizó a fines de la estación reproductiva, en el mes de marzo de 2011. Las muestras fueron extraídas de 3 padrillos de raza Cuarto de Milla definitivo. El padrillo número 1, de RP 141 fue “Grandioso de Lorencita” de 9 años de edad, estado corporal regular, en condiciones de campo, con buena disponibilidad de forraje y 2 yeguas en el mismo potrero. El padrillo número 2, de RP 77 fue “It’s Show Time” de 6 años de edad, estado corporal muy bueno, en condiciones de semi estabulación, alimentado con 4,5 kg de avena, 3 panes de alfalfa por día y acceso a verdeos. Sirvió yeguas con monta dirigida una semana previa al ensayo. El padrillo número 3, de RP 2 fue “Satur Junior” de 5 años de edad, estado corporal muy bueno, en condiciones de campo con buena disponibilidad de forraje.

Los 3 padrillos estaban desparasitados con Equiverm (Laboratorio Richmond División Veterinaria SA, Buenos Aires, Argentina). El padrillo 1 no estaba vacunado, el 2 estaba vacunado con antitetánica y el 3 tenía todas las vacunas al día (Adenitis, Rinoneumonitis, Tétanos e Influenza).

FASE I: Tratamientos

El día 26 de marzo se le administró 2cc de Benzoato de estradiol (Estradiol Dispert®, Benzoato de estradiol, Laboratorio Dispert, Montevideo, Uruguay) a 3 yeguas del establecimiento con el fin de inducir comportamiento estral (48 horas previo a la primer colecta).

FASE II: Elaboración de la ficha clínica

Previo a la primera colecta se examinó a cada uno de los padrillos para elaborar su correspondiente ficha clínica y evaluación de aptitud reproductiva. Se realizaron las respectivas reseñas y se inspeccionaron los genitales externos; primero los testículos y el escroto, luego el pene y el prepucio. Después se procedió a la palpación del testículo y del epidídimo para evaluar consistencia y tono y posteriormente medir la circunferencia escrotal.

FASE III: Preparación de la vagina artificial

Para realizar las colectas se utilizó una vagina artificial de tipo Missouri. Esta consta de una doble camisa de látex, forrada por un armazón de cuero de 55 cm de largo. Presenta una válvula para la introducción de agua y aire con lo que se logra la presión y temperatura adecuadas. Para la colección, se le ensambla una bolsita de plástico, la cual lleva un filtro dentro, y se colocan ambos en una botella colectora, la cual se une al extremo de látex de la vagina. El diámetro de la vagina es más angosto hacia el final, lo que simula los golpeteos de fondo de saco en la vagina de la yegua.

1. Se coloca la camisa interna descartable de polietileno.
2. Se coloca agua a temperatura adecuada dentro de la camisa interna de látex (2-3 L aproximadamente, dependiendo de las necesidades de los padrillos) de forma tal que tuviera una temperatura de 44 °C (Davies Morel, 1999), corroborada con un termómetro de alcohol (Termómetro -10+110 escala interna alcohol, Droguería Paysandú, Montevideo, Uruguay).
3. Preparación de la botella colectora con el filtro de celulosa descartable (Biotay; Minitüb, Tiefenbach, Alemania) dentro de la bolsita y adaptador de la botella.
4. Colocación de la botella colectora en el extremo de la vagina por dentro de la camisa descartable.
5. Colocación de un mínimo de vaselina sólida en la entrada de la vagina sobre la camisa descartable para favorecer la penetración. Cabe destacar que los lubricantes causan efectos osmóticos nocivos para la viabilidad de los espermatozoides (Samper, 2007).

FASE IV: manejo de la yegua

Dentro de un corral redondo se le coloca a la yegua una manea de servicio para inmovilizarla y así evitar daños tanto al padrillo como a los operadores. Se le venda la cola y se la coloca del lado opuesto al que se realiza la colecta evitando así posibles lesiones al pene del padrillo.

FASE V: Extracción de las muestras

El día 29 de Marzo se inició el ensayo. Se le colectaron dos muestras de semen a cada padrillo por día, durante tres días consecutivos.

Rutinariamente antes de sacar las sucesivas muestras lo que se hizo fue:

1. Estimulación del padrillo acercándolo a la yegua receptiva.
2. Lavado con agua tibia y algodón del prepucio y pene post protrusión.
3. Secado con papel absorbente.
4. Colección seminal con la vagina artificial al momento de la monta.

Se cronometraron los tiempos de reacción (desde que se presenta la yegua hasta que protruye el pene), tiempo de monta (desde la protrusión del pene hasta la monta), número de montas antes de eyacular, el comportamiento del padrillo y si realiza zapateo y movimiento de cola.

FASE VI: Estudio seminal

Luego de la colección, se retiró el filtro que sirve para separar la fracción gel de la fracción rica en espermatozoides (Kenney et al., 1983; Papa, 1987; Gastal, 1991). Después, se vuelca el semen en una probeta graduada, donde medimos el volumen total eyaculado. A la vez, evaluamos el aspecto (sin orina, sangre, o contaminantes) y el color (blanco grisáceo lechoso (Bonadonna y col., 1962; Morel, 2005).

Del semen puro, se realizó el estudio microscópico (Nikon, Optiphot, 20x y 40x) la motilidad progresiva subjetiva y el vigor de los espermatozoides. A su vez, se evaluó el pH (tiras Multistixs® SG 10 de Bayer). Se extrajo una alícuota de 20 µl de semen con pipeteador automático (Kacillndústria e Comércio Ltda., Reci-

fe, PE, Brasil) para diluir en 2 mL de formol salino bufferado para el posterior estudio de la morfología y la concentración.

El resto de la muestra se colocó en 2 tubos Falcon con partes iguales de leche UHT descremada Conaprole en uno, y diluyente EquiPro™ (Biotay; Minitüb; Tiefenbach, Alemania) en otro. Se realizó el mismo estudio microscópico que con el semen puro, con estas dos diluciones (motilidad y pH).

Enseguida se almacenaron las muestras con los diluyentes en el Equitainer® (The Hamilton Research, Inc, South Hamilton, Miami, USA). El Equitainer® es un dispositivo especialmente diseñado para el almacenamiento de semen equino a 5 °C. Posee dentro un recipiente aislante junto con dos latas refrigerantes y un anillo de goma interno que, junto con una traba, mantiene un cierre hermético lo cual permite mantener la temperatura interna (<http://www.equitainer.com>).

Una vez obtenidas las 6 muestras del día con sus respectivas diluciones, se procedió a realizar el estudio de termo resistencia. Ésta se efectuó con las muestras diluidas el día de la extracción, a las 24 y a las 48 horas.

Primero se extrajo una alícuota de las diluciones que estaban dentro del Equitainer® para colocarlas en tubos Falcon en los cuales se realizó la prueba de termo resistencia. Esta consiste en colocar los tubos con las diluciones en baño maría a 37 °C. Cada media hora, se saca una gota y se coloca en un portaobjetos, el cual se encuentra en una platina térmica a 37 °C. Se le coloca un cubre objetos y se observa en el microscopio óptico con platina térmica a la misma temperatura, para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides. Esta prueba se realiza durante 4 horas.

A las 24 y 48 horas, también se midió el pH por medio de tiras Multistix® SG 10 de Bayer. A las 48 horas, se extrajo una muestra la cual se diluyó en Formol salino bufferado para el estudio de la morfología.

FASE VII: Morfología y concentración

Una vez terminado el trabajo de campo, en el laboratorio realizamos el estudio de la morfología y la concentración. Esto se pudo hacer gracias a que estaban

en formol salino bufferado el cual los conserva por largos periodos de tiempo (Einarsson, 2009).

La morfología espermática se analizó en un microscopio de contraste de fase con objetivo de inmersión a 100x, contando 100 espermatozoides de cada muestra, evaluando no solo el porcentaje total de anomalías, sino también cada defecto en particular.

La concentración se determinó con cámara de Neubauer (Bright Line, BOECO, Alemania. Profundidad 1/10mm), contando los espermatozoides y multiplicándolo por su factor de dilución.

FASE VIII: Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por un modelo general lineal (Proc GLM, SAS). Se comparó las características de la monta, el semen y el efecto de los diluyentes (motilidad del semen puro y diluido) entre padrillos. La comparación entre medias se realizó por el método LSD, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

El promedio del volumen testicular fue de 292,41±36,09 cc, 402,64±54,11 cc y 236,31±45,21 cc para los padrillos 1, 2 y 3 respectivamente. Las variaciones se deben a que en los tres padrillos, se encontró una diferencia considerable entre cada testículo (100 cc aproximadamente). A su vez, el padrillo número 3 presentó el menor volumen que se explica por su joven edad.

En el cuadro 1 se presentan las características de los distintos aspectos de las etapas del proceso de monta para los tres padrillos utilizados en el estudio.

Cuadro 1. Evaluación de los distintos aspectos de las etapas del proceso de monta y eyaculado de los tres padrillos utilizados en el estudio (media±e.e.m.)

	Padrillo 1	Padrillo 2	Padrillo 3
TR¹	158,2±51,8 ^a	17,3±51,8 ^a	23,5±51,8 ^a
TM²	347,7±137,9 ^a	109,0±137,9 ^a	318,7±137,9 ^a
Saltos³	1,5±0,3 ^a	2,0±0,3 ^a	2,7±0,3 ^a

¹ TR: tiempo de reacción, desde la presentación de la yegua hasta la protrusión del pene en segundos.

² TM: tiempo de monta, desde la presentación de la yegua hasta realización de la colecta en segundos.

³ Saltos: número de saltos previos a la obtención de la colecta.

^a: diferencias entre columnas: P>0,1

El promedio general del tiempo de reacción, tiempo que transcurre desde la presentación de la yegua al padrillo hasta que el mismo protruye el pene, fue de 66,3 segundos. El padrillo número 1 en promedio, tuvo un tiempo de reacción mayor que los restantes. Esto no resultó significativo ya que solo en una colecta este tiempo se prolongó. A pesar de esta ocasión, dichos tiempos fueron similares entre los tres padrillos, no presentándose grandes diferencias.

Las medias del tiempo de monta, tiempo que transcurre desde la presentación de la yegua hasta la realización de la colecta, no variaron significativamente siendo el promedio general 258,44 segundos. La del padrillo 2 es menor porque presentaba mejor libido.

El número de saltos previo a la obtención de la colecta fue de 2,06 no existiendo variaciones estadísticas entre ellas (Cuadro 1).

El cuadro 2 presenta las características de los eyaculados (volumen, gel, pH y motilidad) de los tres padrillos.

Cuadro 2. Características del eyaculado, promedio del volumen, cantidad de gel, pH y motilidad del semen puro de cada padrillo (media±e.e.m.)

Parámetro	Padrillo 1	Padrillo 2	Padrillo 3
Volumen (ml)	28,5±8,3 ^a	72,5±8,3 ^a	42,7±8,3 ^a
Gel (ml)	7,3±3,6 ^b	7,2± 3,6 ^b	2,8±3,6 ^b
pH	7,8±0,1 ^b	7,7±0,1 ^b	7,9±0,1 ^b
Motilidad ¹	75,0±2,5 ^b	72,5±2,5 ^b	80,8±2,5 ^b

¹Motilidad del semen puro. ^a: P<0,1; ^b: P>0,1

El volumen promedio de los tres padrillos fue de 47,9 mL existiendo una variación significativa entre los distintos eyaculados de éstos. Se observó un mayor volumen en el padrillo número 2 y el menor se obtuvo del padrillo número 1.

No existieron diferencias significativas en la cantidad de gel, pH y motilidad del semen puro, obteniendo una media de 5,78 mL, 7,8 y 76,11% respectivamente.

En la figura 1 se muestra la media de volumen, obtenida de eyaculado y la media gel o media obtenida en el volumen de gel, en función del número de colecta.

Las variaciones de volumen fueron significativas (P<0,1). En la primera colecta fue en la que se obtuvo la mayor media, mientras que la menor se obtuvo en la cuarta. En cuanto a la media de gel, la variación no fue significativa a lo largo de las colectas con excepción de la primera. En dicha colecta, dio una diferencia significativa obteniendo una media de 17,33 mL, mayor que las restantes.

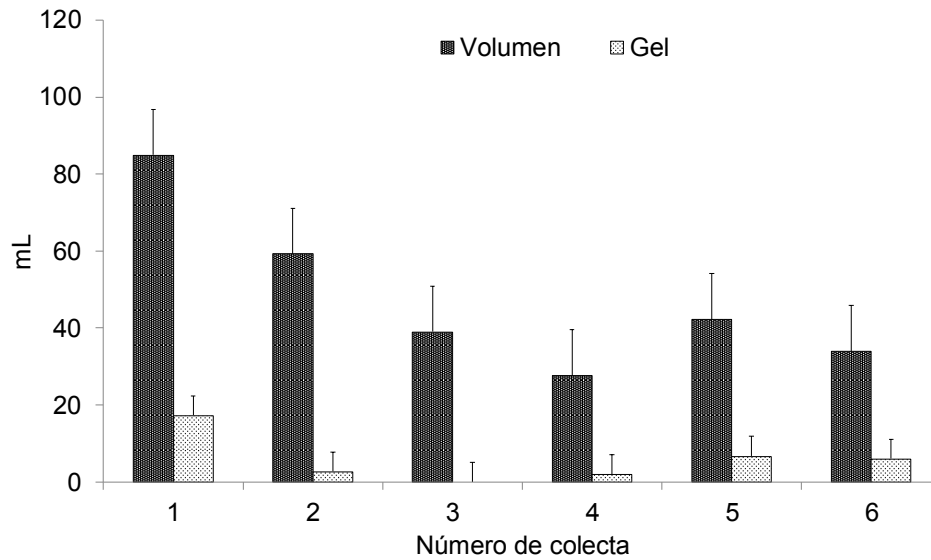


Figura 1. Volumen de eyaculado y gel (mL) en cada colecta.

Los valores de pH no presentaron grandes variaciones entre las colectas. El promedio general del pH fue $7,8 \pm 0,5$.

La motilidad inicial del semen colectado puro fue $76,11 \pm 0,1\%$ no existiendo diferencias significativas entre las 6 colectas. La motilidad inicial por colecta se muestra en la figura 2.

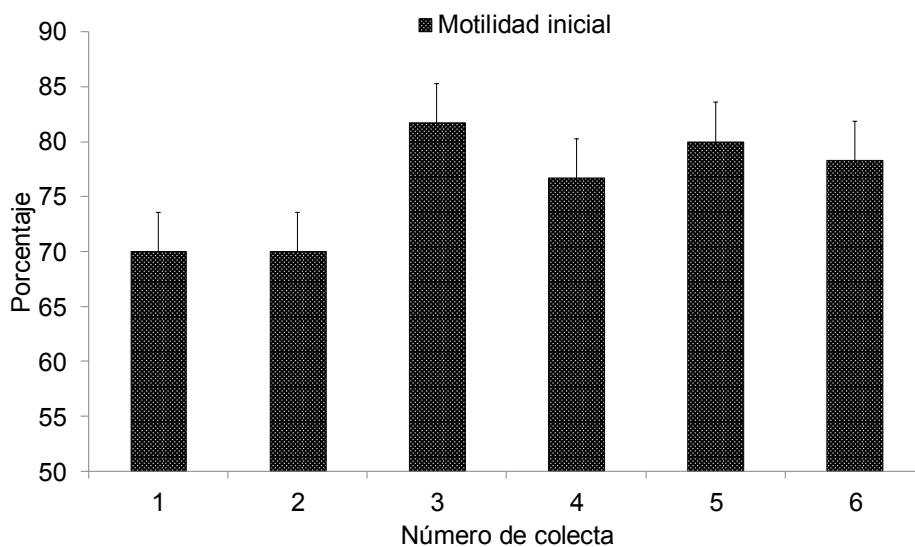


Figura 2. Motilidad inicial del semen colectado, según el número de colectas

La motilidad promedio registrada en diferentes tiempos de evaluación del semen diluido con leche UHT o Equipro®, 1 (fresco), 2 (a las 24 horas) y 3 (a las 48 horas), fue 44,7, 31,1, y 15,8 respectivamente, con un error estándar de 1,1.

En la figura 3 se muestra la motilidad durante el estudio de termorresistencia; se aprecia que la misma va disminuyendo, en el semen fresco, a las 24 y 48 horas, diluido con leche o Equipro®. En la hora 1 se obtuvo la mayor motilidad. Esta fue decreciendo hasta llegar a la hora 8 donde se registró el menor valor.

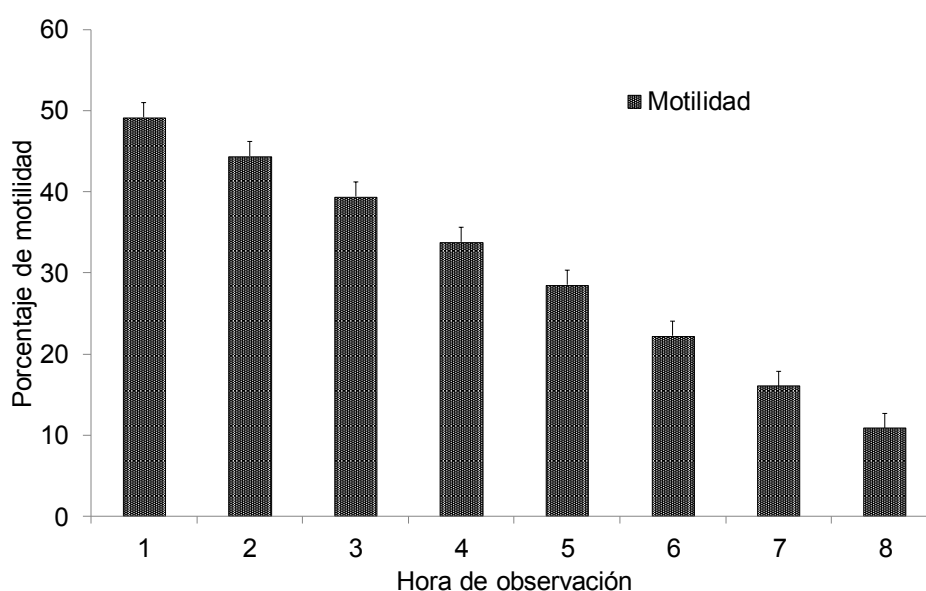
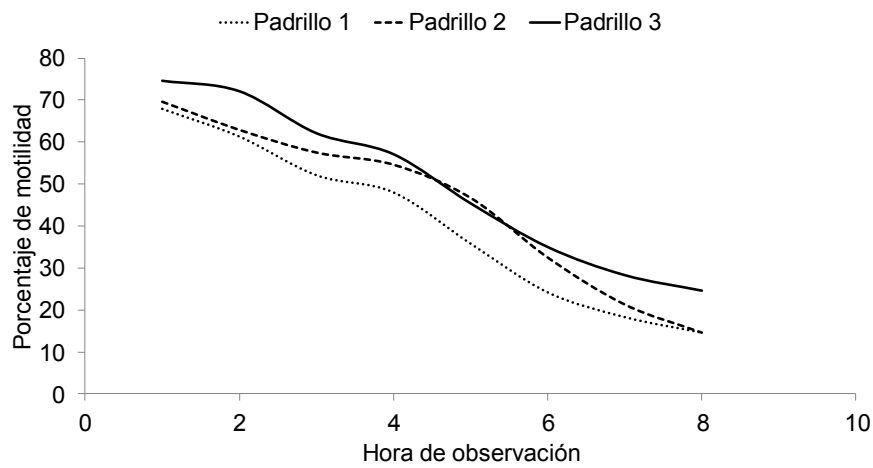


Figura 3. Motilidad promedio en función de cada observación. Entre cada observación existen intervalos de media hora.

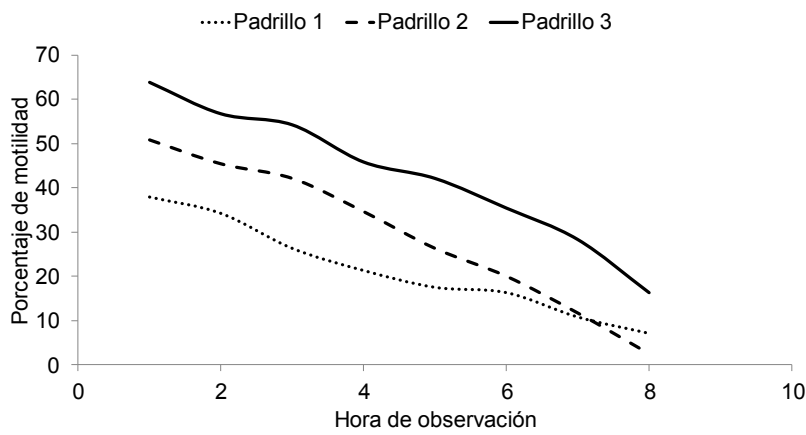
En las figuras 4 a) b) y c) se muestra la motilidad decreciente que presentó cada padrillo con respecto a la hora, diluido con leche UHT y Equipro®, con un error estándar de 5,3. La figura 4a refiere al día de la extracción, la figura 4b a las 24 horas y la figura 4c a las 48 horas.

En las tres figuras, vemos como el padrillo 3 presenta a lo largo de las termoresistencias una mayor motilidad que los dos restantes. El padrillo 1 fue el que por lo general presentó una menor motilidad. Estas diferencias entre las motilidades, resultaron significativas ($P < 0,1$).

4a)



4b)



4c)

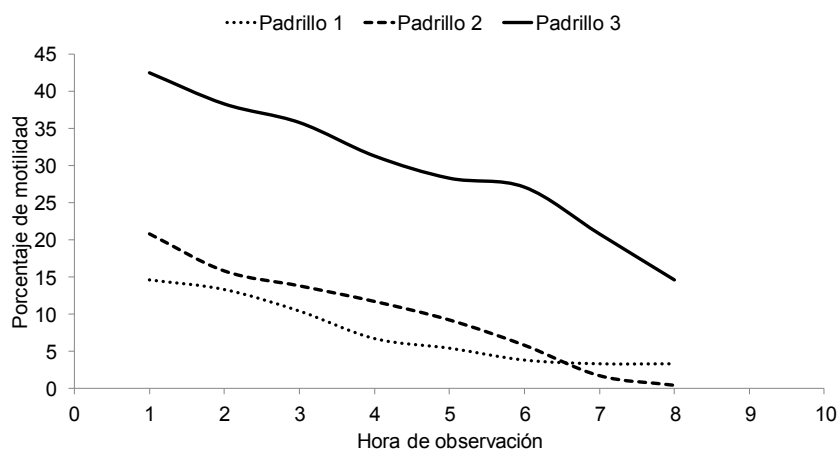
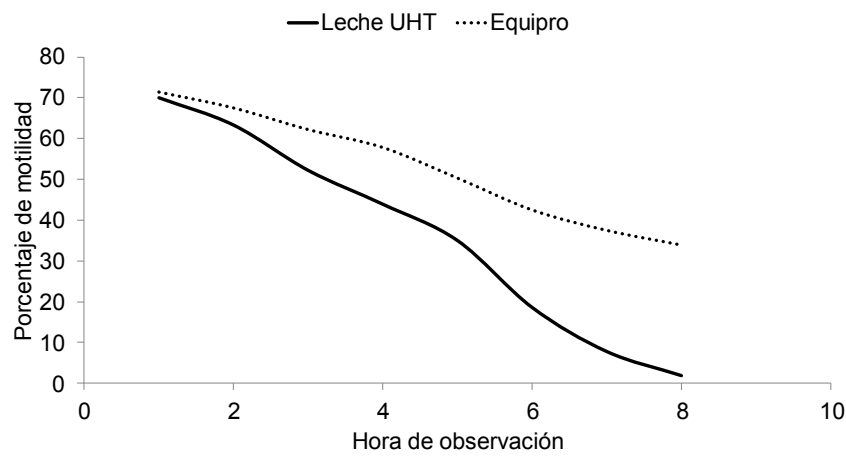


Figura 4. Motilidad promedio del semen de cada padrillo, fresco, a las 24 y a las 48 horas con respecto a la hora.

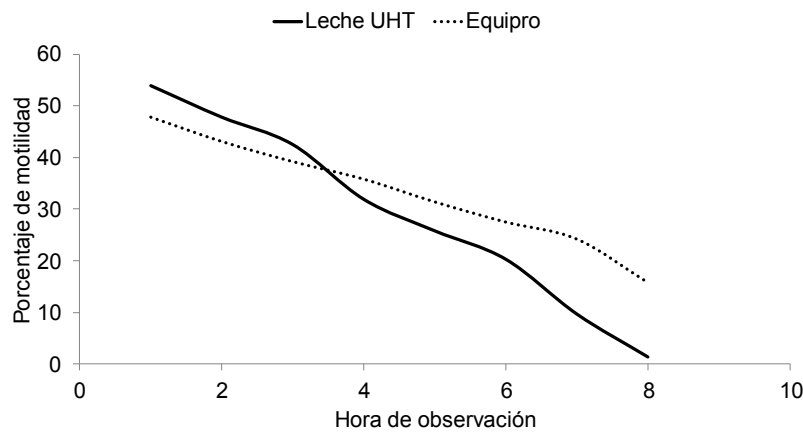
La media de la motilidad para la totalidad de las muestras de la leche descremada UHT fue $27,5 \pm 0,9$; mientras que la del Equipro® fue $33,6 \pm 0,9$, siendo esta diferencia notoria y significativa ($P < 0,1$).

En la figura 5, se aprecia la diferencia de la motilidad del semen diluido con Equipro®, mayor que el diluido con leche UHT. A su vez se evidencia que en este último la motilidad disminuyó más rápido que el diluido con Equipro®, esta diferencia es significativa ($P < 0,1$). Todo esto con un error estándar de 4,5.

5a)



5b)



5c)

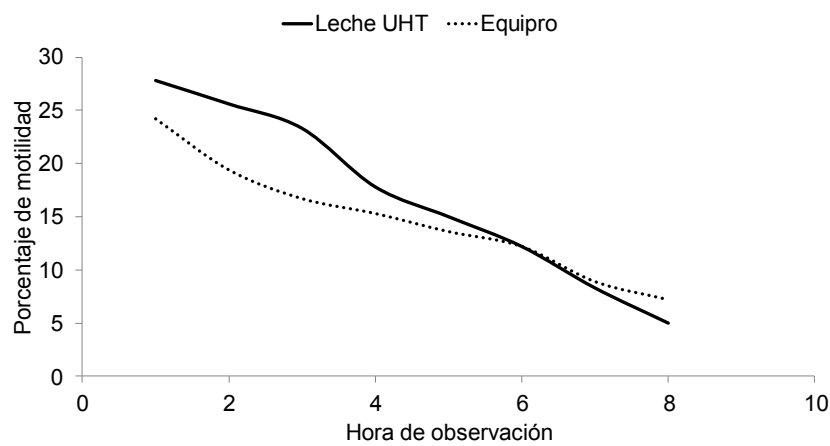


Figura 5. Motilidad promedio del semen de los tres padrillos, fresco, a las 24 y a las 48 horas, en cada diluyente con respecto a la hora.

Cuadro 3. Anormalidades morfológicas del semen, según padrillo (media±e.e.m.)

	Padrillo 1	Padrillo2	Padrillo3
Cabeza¹	9,9±1,2 ^a	12,0±1,3 ^a	13,4±1,3 ^a
Gota Proximal	6,6±0,9 ^b	7,4±0,8 ^b	4,2±0,9 ^b
Gota Distal	3,9±0,9 ^a	3,2±0,6 ^a	3,2±0,6 ^a
Pseudogota	1,7±0,2 ^a	1,4±0,2 ^a	1,8±0,2 ^a
Pieza int²	15,5±1,1 ^b	6,3±1,1 ^b	11,1±1,1 ^b
Cola³	14,2±1,3 ^b	5,6±1,4 ^b	1,3± 6,8 ^b

¹: Microcabeza, problemas de acrosoma, cabeza piriforme, cabeza chata, cabeza suelta.

²:Pieza intermedia doblada

³: Cola doblada, cola enrollada, cola cortada

^a: P>0,1

^b: P<0,1

Cuadro 4. Anormalidades morfológicas según el diluyente (Media± e.e.m.)

	Puro	UHT	Equipro™
Cabeza¹	12,3±1,3 ^a	12,4±1,3 ^a	10,5±1,3 ^a
Gota Proximal	6,5±0,9 ^a	6,4±1,0 ^a	5,4±0,9 ^a
Gota Distal	4,5±0,6 ^b	2,8±0,6 ^b	2,4±0,7 ^b
Pseudogota	1,8±0,2 ^a	1,5±0,2 ^a	1,6±0,3 ^a
Pieza int²	9,1±1,4 ^a	10,7±1,4 ^a	13,1±1,4 ^a
Cola³	6,1±1,6 ^a	10,4±1,5 ^a	10,2±1,5 ^a

¹: Microcabeza, problemas de acrosoma, cabeza piriforme, cabeza chata, cabeza suelta.

²:Pieza intermedia doblada

³: Cola doblada, cola enrollada, cola cortada

^a: P>0,1

^b: P<0,1

La concentración de espermatozoides por mL de semen registró promedios de $214 \times 10^6 \pm 46 \times 10^6$ spz/mL para el padrillo 1 y de $140,5 \times 10^6 \pm 30 \times 10^6$ spz/mL y $217 \times 10^6 \pm 52 \times 10^6$ spz/mL para los padrillos 2 y 3 respectivamente. El gran error se debe a que las concentraciones entre cada colecta variaron ampliamente.

DISCUSIÓN

El tamaño testicular del padrillo número 2 fue el mayor mientras que el padrillo 3 presentó el menor, siendo aproximadamente la mitad. Estas diferencias se pueden atribuir a que el padrillo que presentó menor tamaño no se encontraba en su máximo desarrollo reproductivo debido a su joven edad (5 años). Los testículos de padrillos de 7 años o más son mayores que aquellos de caballos más jóvenes (Thompson, 1979). Por lo tanto se debe de tener que evaluar el tamaño testicular ya que un tamaño normal en un padrillo de 5 años puede ser considerado anormal en un padrillo de 7 años o mayor. A su vez el ensayo se realizó al final de la estación de monta y esto puede haber influenciado el tamaño testicular. Esto se respalda en lo citado por Squires (2011), quien publicó que los equinos son animales de reproducción estacional y las características de los testículos cambian marcadamente a lo largo del año. Sin embargo, a diferencia de otros reproductores estacionales, los padrillos siguen produciendo espermatozoides durante todo el año. Cuando no están en temporada reproductiva, los testículos son 25% más livianos, contienen 35% aproximadamente de células de Leydig menos y por consecuente menos retículo endoplasmático liso (RES, parte de la célula comprometida en la producción de testosterona), contienen 31% menos de células de Sertoli y producen 40% a 50% menos de espermatozoides. Las concentraciones de hormonas involucradas en la función reproductiva también tienden a estar más bajas en época no reproductiva. Hay una correlación positiva entre la producción espermática diaria y el tamaño testicular y fue demostrado por Pickett et al. (1987).

Considerando las características y actitud de monta, el padrillo número 2 fue el que presentó la mayor libido al obtener menor tiempo promedio de reacción y de monta. El tiempo y número de montas hasta una colecta seminal exitosa es influenciado por la libido del padrillo y un ambiente óptimo además de una buena práctica de colecta seminal (Sieme y col, 2004). Los tiempos de reacción del padrillo número 1 fueron relativamente altos. En la colecta número 4 el padrillo obtuvo un tiempo de reacción y monta elevados. Quizás esto se debió a factores ambientales que distorsionaron su atención, los cuales no se tuvieron pre-

sentos al momento de la colecta y no necesariamente se le puede adjudicar estos valores elevados a una pobre libido. A su vez, este padrillo no tenía experiencia en monta dirigida ni en colecta de semen y presentaba una herida en uno de sus miembros posteriores, teniendo en cuenta que cualquier factor doloroso puede afectar su habilidad de monta.

El volumen seminal promedio de los 3 padrillos fue más bajo que la media normal de la raza (70 mL), porque el bajo volumen de eyaculado del padrillo número 1 produjo una disminución en el promedio general. Sin embargo, este valor no se encuentra fuera del rango normal (30-250 mL). La época del año es un factor que pudo haber sido de importancia ya que se obtuvieron resultados de volumen seminal total más bajos de lo normal. Otro factor que afecta el volumen seminal, es la frecuencia de colectas. El volumen de gel, el volumen seminal total, la concentración espermática y el número de espermatozoides por eyaculado disminuyen en eyaculados sucesivos durante un día (Squires y col., 1979). Por esto es importante destacar que se realizaron 2 colectas diarias durante 3 días consecutivos, lo cual puede haber contribuido con el bajo volumen.

Considerando el volumen seminal de cada padrillo en particular, el padrillo número 3 presentó un bajo volumen en relación a los rangos normales debido a su joven edad, siendo este un factor que puede afectar al volumen seminal. El padrillo número 1 registró un menor valor promedio. Esto se debió a que la respuesta a la estimulación no fue exitosa durante la colecta número 4, por lo que no se obtuvo un eyaculado de buena calidad, probablemente este padrillo precisara una mejor estimulación que los restantes. Este padrillo se encontraba a campo con 2 yeguas que si bien no se tiene la certeza de la cantidad de montas que realizaba, puede haber influido en el poco volumen obtenido.

También es importante tener en cuenta para la medición del volumen seminal el número de montas desde la presentación de la yegua hasta la eyaculación. Esto resulta en un aumento de volumen y del número total de espermatozoides con una reducida concentración espermática (Sieme y col., 2004).

En padrillos en los cuales se colecta todos los días, el número de espermatozoides por eyaculado disminuye a medida que aumenta la frecuencia de eyaculados. Cuando se realizan colecciones diarias, se estarían eyaculando todos

los espermatozoides producidos, por ende coleccionar más a menudo resultará en menor concentración por eyaculado (Knottenbelt, 2003). La concentración de espermatozoides registró promedios con un error muy alto ya que se obtuvieron valores muy diferentes en el número de espermatozoides por mililitro en cada colecta. A su vez estos valores fueron disminuyendo para los tres padrillos a medida que se avanzó en las colectas.

Con respecto al pH en el semen puro no hubo grandes variaciones debido a que los padrillos se encontraban sanos y la colecta fue lo más higiénica posible.

En lo que a motilidad seminal se refiere, en trabajos anteriores se ha encontrado que esta no varía entre sucesivos eyaculados (Squires y col., 1979). Sin embargo en el presente estudio, en la primer y segunda colecta se obtuvieron menores motilidades, atribuible a una falta de limpieza previa de las reservas de los padrillos.

Es importante tener en cuenta la concentración bacteriana presente en la muestra, ya que valores altos de la misma producen una marcada depresión en la motilidad espermática. Sin embargo, el recuento bacteriano proveniente de la flora normal del pene y el prepucio no afecta el porcentaje de espermatozoides móviles. En un eyaculado de buena calidad cierto recuento bacteriano puede no disminuir su motilidad drásticamente, mientras que en otro de menor calidad sí. Por lo tanto podemos decir que varía según el eyaculado individual coleccionado de determinado padrillo. Bajas motilidades no son siempre indicativas de poca fertilidad, existiendo otros atributos como ser que el semen no sea resistente a la refrigeración.

Como última característica seminal a evaluar en este estudio, se cree importante contabilizar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales ya que tiene una correlación positiva con la motilidad espermática. Es asumido que espermatozoides morfológicamente normales van a tener una buena motilidad y serán capaces de fertilizar. En términos generales, el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en una muestra seminal es similar al porcentaje de espermatozoides móviles (Knottenbelt, 2003). Si la motilidad espermática es baja y el porcentaje de espermatozoides normales es alta es

sugestivo que ocurrió un error de laboratorio, lo cual llevó a la disminución de la motilidad espermática. No se puede descartar, sin embargo, un efecto negativo potencial en el plasma seminal en las características de motilidad del espermatozoide (Dickson y col., 2011).

En cuanto a las anormalidades morfológicas de semen según el padrillo la anomalía más frecuente entre los 3 padrillos fue de cabeza. Esto se debe a que se engloban varios problemas como microcabezas, problemas de acrosoma, cabezas piriformes, cabezas chatas y cabezas sueltas. Estas anomalías se pueden clasificar dentro de las primarias como fallo de la espermatogénesis o como terciarias por manipulación inadecuada luego de la extracción. La disrupción del acrosoma antes de que el espermatozoide se una a la zona pelúcida del ovocito de la hembra deja a ese espermatozoide incapaz de fertilizar el oocito (Graham, 2001). Este tipo de daños pueden representar problemas a largo plazo o permanentes mientras que si se trata de la anomalía por una causa terciaria no. Las anomalías de pieza intermedia son significativas siendo éstas de mayor importancia en el padrillo 1 y 3. Se evidencia que el padrillo número 1 presenta un alto índice de anomalías en la pieza intermedia como ser pieza intermedia doblada, indicativo de una anomalía terciaria por una manipulación inadecuada luego de la eyaculación. La destrucción de las mitocondrias en la pieza intermedia lleva a una incapacidad de producir ATP el cual es utilizado por las fibras de la cola para causar el movimiento del espermatozoide. Este daño producido a la mitocondria puede ser físico (por mala técnica de refrigerado o congelado) o químico (por cambios de pH u osmolaridad) (Graham, 2001). Los problemas de gotas citoplasmáticas a nivel de la pieza intermedia no fueron significativos pudiendo descartar fallos secundarios o de maduración espermática. Las anomalías morfológicas de la cola como ser colas dobladas, enrolladas o cortadas resultaron con diferencias significativas presentando los mayores valores el padrillo número 1. Estos problemas se clasifican como primarios o terciarios. En la cola se encuentran las fibras que permiten el movimiento espermático hacia el oocito. Daños en la cola alteran la viabilidad del espermatozoide a nadar al oocito y por lo tanto penetrar la zona pelúcida y fertilizar el oocito (Graham, 2001). Dickson y col. (2011), han demostrado que ciertos defectos morfológicos como gotas citoplasmáticas y colas

dobladas parecen tener un efecto menor sobre la fertilidad, mientras que defectos como de cabeza, cola enrollada, pieza intermedia doblada, tienen efecto deletéreo en la misma. En general, espermatozoides morfológicamente anormales no tienen una influencia negativa en los espermatozoides normales.

Las características seminales según el diluyente no tuvieron diferencias significativas en cuanto al pH y alteraciones morfológicas. Sin embargo, la media de la motilidad según el diluyente fue mayor para el Equipro™ que para la leche UHT. En un estudio realizado por LeFrappier y col.(2010), se demostró que la motilidad disminuye desde las 0 a las 24 horas y de las 24 a las 48 horas, quizás por los componentes energéticos de cada diluyente. Esta disminución puede estar indicando la disminución de la viabilidad de los espermatozoides. A su vez, las muestras diluidas con Equipro™ presentaron mayor termorresistencia que las diluidas con leche UHT. Según los resultados que arrojó nuestro estudio, se debería de utilizar la leche UHT como diluyente para inseminar con semen fresco ya que a las 24 y 48 horas alcanza rápidamente una motilidad menor al 25%. Sin embargo, el Equipro™ permite inseminar con el semen fresco y refrigerado hasta las 24 horas.

Hay que tener en cuenta que no todos los padrillos tienen semen apto para sobrevivir el proceso de refrigeración. Al refrigerar el semen la fertilidad de los espermatozoides en algunos padrillos se ve reducida. Cualquier efecto adverso al que se someta el espermatozoide impactará negativamente sobre su fertilidad afectando así el uso del semen refrigerado.

Conclusión

En virtud que el Equipro™ mantiene la viabilidad del semen por más tiempo que la leche descremada (48 vs. 24 horas) pero su costo es superior, la decisión de optar por uno u otro de estos diluyentes dependerá del tiempo estimado entre la colección del semen y la inseminación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Batellier F.; Vidament M.; Fauquant J.; Duchamp G.; Arnaud G.; Yvon J.M.; Magistrini M. (2001) Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 68:181-190.
2. Bedford S.J.; Jasko D.J.; Graham J.K.; Amann R.P.; Squires E.L.; Pickett B.W. (1995) Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*; 43:955-967.
3. Blanchard, T.L.; Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; (2003) Semen collection and Artificial Insemination. *Manual of Equine Reproduction*. 2a. ed. St. Louis, Mosby, pp. 131-142.
4. Blanchard, T.L.; Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; (2003) Examination of the Stallion for breeding Soundness, *Manual of Equine Reproduction*. 2a. ed. St. Louis, Mosby, pp. 143-164.
5. Blanchard, T.L.; Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; (2003) Semen preservation, *Manual of Equine Reproduction*. 2a. ed. St. Louis, Mosby, pp. 165-177.
6. Boeta M.; Zarco L. (1999) Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *E-journal UNAM México, D.F.*
7. Boeta M; Zarco Quintero L (2000) Utilización de leche descremada ultra pasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro destinado a la inseminación de yeguas. *Vet.Méx* 31:67-69.
8. Brinsko S.P.; Varner D.D.; Blanchard T.L. (2000) Transported equine semen. *Ball B.A: Recent Advances in Equine Reproduction International Veterinary Information Service Website, (www.ivis.org)*, Nueva York, A207.0400, pp. 152-158.
9. Brinsko, S.P.; (2007) Sperm Notes. *El boletín internacional por la IA de equino de Minitübe*. Nr 01/2007.
10. Card C. (2010) Morphologic abnormalities of sperm. *Italian Association of Equine Veterinary Congress*. 16, Carrara, Italia, pp. 1-14.
11. Cunningham J (1999) *Fisiología Veterinaria*. 2a. México, D.F. Ed McGraw-Hill Interamericana, 763 p.

12. Davies Morel Mina CG; (2005) Inseminación Artificial, Fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo. 2a. Zaragoza, Ed Acribia, pp. 335-351.
13. Dickson D; Varner (2011) The Ins and Outs of Sperm Management. Symposium of the American Association of Equine Practitioners. 13, St. Michael, Barbados, pp.82-97.
14. Douglas-Hamilton DH.; Osol R.; Osol G. (1984) A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22:291-304.
15. Dyce KM.; Sack WO.; Wensing CJG. (1999) Anatomía Veterinaria. 3a. ed. Nueva York, McGraw-Hill Interamericana, 920 p.
16. Einarsson, S.; Dalin, A.M.; Lundeheim, N.; (2009) Sperm Production and Sperm Morphology of Swedish warmblood stallions. *Reprod Dom Anim*; 44:33-36.
17. Ellington J.E.; Samper J.C.; Wright W.R. (2000) Stallion sperm interactions with oviduct cells in vitro as an indicator of field fertility. *International Congress Animal Reproduction AI.14*, Estocolmo, Suecia, pp.276.
18. Gastal MMO. (1991). Estudo do comportamento sexual e características seminais de asininos. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. 101 p.
19. Gordon, I. (1997) *Controlled Reproduction in Horses, Deer and Camelids*. Wallingford, CAB INTERNATIONAL, 215 p.
20. Graham JK (2001) Assessment of Sperm Quality. Symposium of the American Association of Equine Practitioners. 47, California, EEUU, pp.302-305.
21. Heiskanen, M.L.; Huhtinen, M.; Pirhonen, A., et al. (1994) Insemination results with slow -cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta Vet Scand*; 35(3):257–262.
22. Kenney RM.; Hurtgen J.; Pierson R.; Witherspoon D.; Simons J. (1983) Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Society for Theriogenology. 100 p.
23. Knottenbelt, D.; Le Blanc, M.; Lopate, C.; Pascoe R. (2003) *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. Edinburgh, Saunders, 402 p.

24. LeFrappier L; Walston L; Whisnant CS (2010) Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. *Journal of Equine Veterinary Science* 30:200-204.
25. Melo MIV, Henry M, Beker ARCL. (2005). Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 57:757-763.
26. Metcalf E. S. (2005) Optimizing Pregnancy Rates Using Frozen-Thawed Equine Semen. AAEP. Seattle, American Association of Equine Practitioners. 51, Kentucky, EEUU, pp.120-122.
27. Pagl R; Aurich E; Müller-Schlösser F; Kankofer M; Aurich C (2006) Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 8°C. *Theriogenology* 66:1115-1122.
28. Papa FO. (1987) Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Tese Livre Docência em Reprodução Animal. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 150 p.
29. Pickett BW.; Faulkner LC.; Seidel GE.; Berndtson WE; Voss JL. (1976) Reproductive physiology of the stallion. IV. Seminal and behavioral characteristics. *J AnimSci* 43:617-625.
30. Pickett BW; Voss JL; Bowen RA; Squires EL; McKinnon AO (1987) Seminal characteristics and total scrotal width a normal and abnormal stallions. *Proceedings of the 33rd Annual American Association of Equine Practitioners Convention*, Nueva Orleans, EEUU, pp. 487-518.
31. Rigby SL.; Brinsko SP.; Cochran M.; Blanchard TL.; Love CC.; Varner DD. (2001) Advances in cooled semen Technologies: Seminal plasma and semen extender. *Anim Reprod Sci* 68:171-18.
32. Samper JC.; Vidament M.; Katila T., et al. (2002) Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. *Theriogenology* 2002; 58:647-650.
33. Samper JC. (2007) Reproductive system: evaluation of the breeding stallion. *Anais: Fórum Internacional de Medicina Eqüina, ABRAVEQ, São Paulo*. 18 p

34. Schumacher J.; Moll HD. (2011) A Manual of Equine Diagnostic Procedures. Washington DC, Ed. TetonNewMedia. 181 p.
35. Sieme H.; Katila T.; Klug E., (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61: 769–784.
36. Squires EL (2011) Management of Stallions for Máximum Reproductive Efficiency. Congreso Argentino de Reproducción Equina. 2, Mendoza, Argentina, pp 19.
37. Squires EL (2011) Management of Stallions for Máximum Reproductive Efficiency. Congreso Argentino de Reproducción Equina. 2, Mendoza, Argentina, pp 19.
38. Squires EL; Pickett BW; Amann RP (1979) Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *J Reprod Fertil Suppl*, 27:7-12.
39. Thompson DL; Pickett VW; Squires EL; Amann RP (1979) Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *J. Reprod. Fert.* 27:13-17.
40. Tibary A.; Rodríguez JS. (2011) Causes and management of subfertility in stallions. Congreso Argentino de Reproducción Equina. II, Mendoza, Argentina, pp. 41-54.
41. Varner D.D.; Schumacher J.; Blanchard T.L.; et al (1991) Diseases and management of breeding stallions. California. Goleta, American Veterinary Publications, 360 p.
42. Youngquist, RS, Threlfall, WR (1997) Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2. 2a. St Luis, Ed. Saunders, 1061 p.