

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

UNAN – León.

Medicina Veterinaria.



**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
LINCENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA**

Tema:

Efectos en la post-crio conservación sobre la motilidad
progresiva de los espermatozoides de semen equino
utilizando tres diferentes diluyentes

Autor:

Br. Oliver Corea Moreno.

Tutor:

Dr. Yavar Cisneros

León, septiembre de 2011.

INDICE.

Contenido pagina.	N° de
I. Agradecimiento.	3
II. Dedicatoria.	4
1. Resumen	5
2. Introducción.	6
2.1. Antecedentes.	7
2.2. Justificación.	8
2.3. Planteamiento del problema.	9
3. Objetivos.	11
4. Marco Teórico.	12
5. Diseño metodológico.	29
6. Material y método.	32
7. Resultados y discusión.	47
8. Conclusiones.	53
9. Recomendaciones.	54
10. Bibliografía.	55
11. Anexos.	56

Agradecimiento.

Expreso mi más grande agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, por brindarme su apoyo, su conocimiento, su experiencia, su confianza y darme la oportunidad de trabajar en las instalaciones adecuadas para su culminación exitosa:

- Lic. José Arauz.
- Dr. Ángel Vallesillos.
- Sr. Piero Cohen.
- Dr. Yavar Cisneros.
- Dr. Harold Gillet.

Dedicatoria

A Dios por darme todo lo necesario para poder hacer realidad las metas de mi vida.

A mi Familia por su soporte incondicional y su aliento para superarme cada día y para ser una persona mejor.

A Mis Tutores por brindarme su experiencia y conocimiento durante todo el transcurso de la carrera.

RESUMEN

La preservación del semen equino utilizando diferentes técnicas ha tenido grandes avances en los últimos 60 años especialmente en España, Francia, Brasil y otros países donde la crianza equina tiene gran importancia cultural. Los estudios más modernos incluyen la selección de los sementales, obtención del semen, la centrifugación y finalmente la congelación utilizando nitrógeno líquido.

Este estudio se realizó siguiendo la técnica descrita en las investigaciones más recientes que basan su éxito en la secuencia de todos estos procedimientos. Iniciamos con la selección de 6 sementales entre españoles y lusitanos, de cada uno se obtuvieron dos eyaculados diferentes en un intervalo de 3 días, las cuales fueron procesadas para su posterior prueba de congelación con 3 diferentes diluyentes se observaron los resultados de cada semental post congelado observando su motilidad progresiva y para poder determinar cuál de los de los diluyentes es el más adecuado para cada semental.

Se observó que cuatro muestras de semen presentaron mayor motilidad progresiva con el diluyente que contenía dimetil formamida equivalente a 66.67%, uno de ellos con el diluyente con Glicerol igual al 16.67% y un último con el diluyente comercial E-Z^l correspondiente al 16.67%. Estas seis muestras presentaron la motilidad progresiva más alta siendo ésta la característica más importante para la fecundación.

Introducción.

El presente trabajo de investigación fue realizado en El Cortijo el Rosario ubicada en el km 134 carretera a Corinto que se dedica a la producción equina de las razas Pura sangre Española y Pura sangre Lusitana. Esta cuenta con un laboratorio equipado para los requerimientos de la crío conservación de semen equino.

El desarrollo de técnicas adecuadas para la preservación, almacenamiento y transporte de semen equino son procedimientos de gran importancia que posibilitan el mejor aprovechamiento de animales de gran potencial genético, el almacenamiento de material genético de animales que no están a disposición y es considerado el mejor seguro biológico de reproductores genéticamente superiores. En Nicaragua estas técnicas no han sido desarrolladas debido a los alto costo de los equipos, falta de personal capacitado, poca disponibilidad de reactivos e infraestructuras apropiadas.

Siendo este el primer trabajo investigativo realizado en Nicaragua sobre la conservación e implementación de técnicas para la crío conservación de semen equino.

Antecedentes.

El desarrollo que ha tenido la inseminación artificial (I.A.) de la especie bovina en los últimos 50 años, frecuentemente hace olvidar que la primera I.A. de que existe referencia escrita, se realizó en una yegua en 1332, por iniciativa de un jeque árabe.

La conservación de semen equino por congelación aún sigue en la etapa experimental, a pesar de que ya en 1963 Buell (1963) en Gran Bretaña y Kotjaigina et al (1963) en la ex URSS informaron de las primeras gestaciones con semen congelado. En los últimos años viene observándose un aumento de interés por la congelación de semen equino. Las modificaciones tecnológicas descritas por Martin et al (1978), entre ellas la utilización de EDTA (etilendiamino tetraacetato), ya utilizado anteriormente por autores rusos (Platov y Fomina 1976), han sido incorporadas y probadas por investigadores de Colorado (Loomis et al 1983) y perfeccionadas por Cochran et al (1984) y Cristanelli et al (1984).

En Córdoba España estudios realizados por el Dr. Ángel vallesillos en donde la conservación de la motilidad progresiva de los espermatozoides en semen equino ha sido exitosa donde los diluyentes que contienen glicerol son de gran efectividad (comunicación personal).

En Estados Unidos también se han reportado estudios para la conservación de la motilidad de los espermatozoides equinos con diferentes diluyentes tanto comerciales como modificados por los autores en diferentes razas equinas así como su fertilidad mostrando diferencias entre la motidad progresiva pero resultados similares en la fertilidad. (M. Vidament, J.M. Yvon, I. Couty, G. Arnaud, J. Nguekam -Feugang, P. Noue, S. Cottron, A. Le Tellier, F. Noel, E. Palmer, M. Magistrini).

En Nicaragua no es de nuestro conocimiento que hayan sido reportados estudios para la crio conservación de semen equino y la conservación de su motilidad, debido a los altos costos, materiales y equipos necesarios así como personal capacitado por lo que podemos decir que este es el primer estudio en nuestro país sobre crio conservación de semen equino.

Justificación.

La crío conservación del semen está considerada como el mejor método para la preservación del banco genético de especímenes de gran valor e interés biológico desarrollado en países de tecnología avanzada y utilizada para rescatar especies en extinción, optimizar el aprovechamiento de los reproductores, disminuir los costos, etc.

Dado que a lo largo de la historia de la crianza equina las características seleccionadas han sido entre otras la belleza, movimiento, docilidad, altura, inteligencia, resistencia, fuerza, etc. Y que los estándares reproductivos no fueron fundamentales en su selección se han generado las diferentes particularidades del semen equino que varían en cada raza y en cada semental y que están influidas directamente por los factores ambientales.

Estas particularidades del semen equino hacen necesarios los estudios específicos de la crío conservación del semen de cada semental seleccionado en El Cortijo El Rosario para la posterior iniciación del banco genético en esta empresa y respaldar la utilización del semen de padrotes que tienen las características que los criadores valoran en sus sementales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué efectos producen en la post crio conservación sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de semen equino tres diluyentes diferentes, en El Cortijo El Rosario departamento de Chinandega en el periodo de marzo a abril del 2011?

Objetivo General.

- Determinar los efectos en la motilidad progresiva de los espermatozoides en la post crio conservación de semen equino con tres diluyentes distintos en El Cortijo El Rosario departamento de Chinandega en el periodo comprendido de marzo a abril del 2011.

Objetivos Específicos.

- Iniciar la creación de un banco genético de los sementales elegidos para este estudio.
- Seleccionar el diluyente más adecuado para la crio -conservación del semen de cada semental elegido para la crio-conservación de sus espermatozoides.

Marco Teórico.

La inseminación artificial es actualmente, una técnica muy difundida en la corriente de la reproducción equina. Existen relatos árabes de inseminación con semen fresco del siglo XIV (Brisko & Varner, 1992 apud Perry, 1945), siendo así su popularización en el siglo XIX.

La inseminación artificial es efectiva para mejorar el aprovechamiento de garañones en programas de reproducción. Cuando la manipulación de semen y los procedimientos en la inseminación artificial son apropiados, se pueden alcanzar óptimas tasas de preñes. Los índices de fertilidad conferidos por esta técnica son similares a los de la monta natural (Mattos & Cavalheiro, 1988; Mattos, 1995; Mattos *et al.*, 1996). Entre otras ventajas ofrecidas por la técnica, se observa que el semental puede servir un mayor número de yeguas en la misma temporada, aumentando su eficiencia reproductiva y reduciendo el riesgo de enfermedades venéreas así como accidentes durante la cobertura (Brisko & Varner, 1992).

Los diluyentes son soluciones destinadas a proteger a los espermatozoides en condiciones ambientales desfavorables y prolongar su sobrevivencia (Pickett & Amann, 1987; Brinko & Varner, 1992). Los diluyentes deben de poseer osmolaridad compatible con la de los espermatozoides, equilibrio adecuado de los elementos minerales, una combinación adecuada de nutrientes, sustancias adecuadas capaces de neutralizar los productos tóxicos de los espermatozoides, elementos que protejan a los espermatozoides de cambios de temperatura, especialmente del choque térmico, elementos que estabilicen sistemas enzimáticos y que mantengan la integridad de la membrana.

Características de los espermatozoides equinos.

Para que ocurra la fertilización del oocito los espermatozoides deben desarrollar y mantener cinco aspectos generales (Amann & Pickett, 1987; Amann & Pickett 1989).

- a) metabolismo para la generación de energía.
- b) motilidad progresiva.
- c) enzimas localizadas en el acrosoma que son esenciales para la penetración de estructuras periféricas del oocito.
- d) una distribución apropiada de lípidos en la membrana plasmática y acrosoma, de forma que estabilice estas estructuras durante la fertilización y permitir la función de la membrana en el momento adecuado;
- e) proteínas de la membrana plasmática que son esenciales para la supervivencia del espermatozoide en el tracto genital femenino, para la acción supresora de inmunidad, así como para interacciones necesarias con células epiteliales en lugares determinados y para el acoplamiento del espermatozoide con la membrana del oocito al momento de la fertilización.

Características estructurales.

Los espermatozoides están compuestos por cabeza y cola, ambos envueltos por una membrana plasmática, la cabeza posee un núcleo con ADN con el material genético que será transferido al óvulo, y un acrosoma conteniendo enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración del óvulo durante la fertilización (Amann & Graham, 1993).

A causa de la composición de una región llamada el cuello (ligado a la cabeza), por la parte intermedia que contiene las mitocondrias, por la parte principal que contiene vainas fibrosas y por la parte final que contiene microtúbulos (Amann & Graham, 1993). La parte principal que alarga el contenido de las vainas fibrosas envueltas por estructuras nerviosas que facilitan el movimiento de la célula

espermática y densas fibras que se extienden por toda la parte principal (Amann & Graham, 1993).

Las estructuras microtubulares y fibrosas son importantes para la movilidad del espermatozoide por que contienen una pareja grupal de axonemas de densas fibras y de vainas fibrosas en la parte media y en la parte principal. El centriolo tiene un importante papel en la formación de la cola. El centriolo proximal está localizado desde la fosa de la región del cuello antes de la porción inicial de la cola. A lo largo de la cola del espermatozoide esta pasa a ser denominado centriolo distal formando un axonema, el espermatozoide equino es envuelto por nueve densas fibras estando presentes a lo largo de la parte medial, la parte principal y la parte final (Amann & Graham, 1993).

La parte final está compuesta solamente por el axonema y unos simples microtúbulos por la membrana plasmática (Amann & Graham, 1993).

Como el espermatozoide es considerado una célula con un núcleo altamente condensado y de estructuras microtubulares, fibrosas y membranosas presenta diferentes respuestas ante choques térmicos a bajas temperaturas y a la criocconservacion. Sin embargo las estructuras membranosas son muy sensibles a daños durante el refrigerado caracterizándose su importancia durante el choque térmico (Amann & Graham, 1993).

La membrana plasmática envuelve todo el espermatozoide y está compuesta por tres grupos: una pareja de grupos lipídicos, una interfase fosfolipido-agua y un glicocalis, la pareja grupal lipídica está compuesta por fosfolípidos polares, colesterol y proteínas. La porción de colesterol y fosfolípidos así como en la naturaleza dos fosfolípidos determinan la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide de (Amann & Graham, 1993). En general entre mayor sea la cantidad de colesterol menos flexible y fluida será esta porción de membrana siendo fundamentales los eventos que requieren la fusión de membranas, como

en la reacción acrosomal. (Gilbert & Fales, 1996). La membrana plasmática se encuentra fluida a temperatura corporal (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los tipos de fosfolípidos que componen a la membrana y una cantidad de colesterol presente influyen la respuesta de toda la estructura membranosa en el refrigerado.

Las proteínas de la membrana plasmática son clasificadas como integrales esenciales para la estructura de la membrana, o periféricas (asociadas con la membrana o fácilmente removibles). Algunas proteínas integrales funcionan como poros o canales a través de la membrana o son receptoras para otras moléculas (Amann & Graham, 1993).

Características metabólicas.

Los espermatozoides poseen capacidad limitada de biosíntesis y reparación celular. Muchos componentes necesarios para el funcionamiento y el metabolismo de los espermatozoides son sintetizados durante la espermatogénesis, para que un espermatozoide mantenga sus funciones y produzca energía, es necesario que este inicie los procesos catabólicos (como la glucólisis) mantenga la movilidad, mantenga el balance iónico y funciones celulares diversas (Inskip & Hammerstedt, 1985).

Para obtener esta energía el espermatozoide depende en un 90% de sustratos extracelulares, principalmente carbohidratos (Amann & Graham, 1993). En varias especies los espermatozoides metabolizan rápidamente monosacáridos como glucosa y fructuosa, mas no metabolizan otros azúcares más complejos (Mann, 1964). Los espermatozoides equinos, poseen capacidad limitada para el uso de fructuosa, cuando los comparamos con los espermatozoides de otras especies y no son capaces de metabolizar el sorbitol, un importante componente del plasma seminal equino, otros sustratos utilizados por los espermatozoides incluyen el ácido láctico, el glicerol, ácidos grasos y aminoácidos (Mann, 1964).

Los azúcares metabolizados son transportados a través de la membrana plasmática por el transporte específico de las proteínas, siendo este proceso no muy bien conocido en el espermatozoide equino. El transporte de la fructuosa a través de las proteínas puede estar ausente en el espermatozoide equino, el que explicaría la capacidad limitada del espermatozoide equino para metabolizar fructuosa (Mann, 1964).

Componentes del metabolismo endógeno contribuyen en un 10 % para la energía celular y la producción de ATP en el estado fisiológico (Mann, 1964; Hammerstedt & Lovrien, 1983). El espermatozoide no tiene reserva de glucógeno y presenta carencia de enzimas necesarias para el uso de glucógeno como fuente de energía (Inskeep & Hammerstedt, 1985).

El uso de ATP también ha sido estudiado en algunas especies, mas no directamente en el espermatozoide equino, en el espermatozoide bovino, 60% del ATP producido es utilizado para mantener la motilidad sin embargo el 40% se pierde por el sustrato cíclico.

Varios iones afectan la motilidad y la respiración espermática. Componentes que estimulan a los espermatozoides incluyen PO_4 y Na_2HCO_3 en bajas concentraciones de K^+ o el Mg^{++} (Mann, 1964; Hoskins *et al.*, 1978; Vijayaraghavan *et al.*, 1985; Wales & Murdoch, 1971; Peterson & Freund, 1973) y los iones que inhiben la motilidad o el metabolismo incluyen H^+ , Mn^{++} , Ca^{++} y en altas concentraciones de Mg^{++} (Mann, 1964).

Espermatozoides de diferentes especies presentan la capacidad de utilizar la respiración aeróbica. Espermatozoides de toros y carneros presentan mayor capacidad de utilizar la respiración anaeróbica que los espermatozoides equinos, dependientes básicamente de la respiración aeróbica (Mann, 1964).

Una de las consecuencias del metabolismo aeróbico es la producción de peróxido de hidrogeno en la mitocondria, el cual se torna toxico para la célula espermática y potencializa la peroxidación de lípidos en la membrana plasmática (Jones *et al.*, 1979; Holland & Storey, 1981; Alvarez & Storey, 1984a; Alvarez & Storey, 1984b., Aitken & Clarkson, 1987).

La peroxidación de lípidos causa disfunciones de ciertas enzimas metabólicas, aumentando la permeabilidad de la membrana plasmática (Alvarez & Storey, 1984a), dañando su estructura, afectando la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Jones *et al.*, 1979).

Las especies reactivas al oxigeno como el peróxido de hidrogeno, a pesar de producir efectos negativos, cuando en bajas concentraciones se presentan como mediadores de los procesos de capacitación, hiperactivacion y reacción acrosomal del espermatozoide (DeLamirande & Gagnon, 1993; Gilbert & Fales, 1996; DeLamirande *et al.*, 1997).

El metabolismo aeróbico del espermatozoide inmóvil agota el oxigeno disuelto en el diluyente o en el plasma seminal, forzando al mismo a realizar un metabolismo anaeróbico que tiene como producto final el acido láctico (Mann, 1964). Esto ocurre por ejemplo cuando el semen es refrigerado a bajas temperaturas como a 5 °C.

Esta acumulación de acido láctico y a su vez la reducción del ph del medio, disminuyendo el metabolismo y la producion de ATP acabando con la motilidad espermática (Amann & Graham, 1993). La mantención del ph intracelular del espermatozoide de semental es importante para mantener la movilidad en el metabolismo espermático (Taylor, 1981).

Métodos de valoración del semen.

La valoración del semen sano es de gran importancia para que estas sean analizadas con su capacidad de fecundación del espermatozoide, tales como motilidad, integridad morfológica (principalmente del acrosoma), funcionalidad de la membrana e integridad de la membrana plasmática.

Johnson *et al.* (1996) afirma que el uso de una única prueba para validar el potencial fecundante del espermatozoide es ilusorio, por lo tanto la combinación de varias pruebas dará mayor seguridad en la estimativa de la función espermática.

Motilidad.

La motilidad es uno de los dos principales métodos para validar la preservación de los espermatozoides, siendo utilizada en diversos estudios para obtener comparaciones entre diluyentes, métodos de refrigeración y diluciones utilizadas. Su observación es considerada un elemento importante en la validación de la función espermática (Kenney *et al.*, 1983; Varner *et al.*, 1988; Pickett *et al.*, 1993). Siendo un componente indispensable en el mecanismo de la fertilización, si la pérdida de esta es irreversible resultaría en la pérdida de la función celular. Por otro lado su manutención implica la integridad celular completa (Varner *et al.*, 1988) ya que tiene correlación absoluta con la fertilidad (Pace & Sullivan, 1975; Bedford *et al.*, 1995; Keller, 1998).

El objetivo de validar la motilidad espermática es determinar la cantidad de espermatozoides totales vivos dentro de un eyaculado, para poder obtener una valoración más refinada y la posibilidad de poder obtener el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, pues estos representan gran fertilidad (Pickett & Voss, 1972).

Entiéndase por motilidad progresiva el porcentaje de células que se mueven activamente hacia adelante, incluyéndose también a los espermatozoides que se mueven en círculos amplios debido a la alta ineficiencia de las implantaciones de la cola (Bielanski & Kaczmariski, 1979). La motilidad total es definida como un porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento circular, pendular, progresivo o en serpiente.

El número de espermatozoides con motilidad progresiva, han de servir como criterio de validación del potencial de fertilidad del semental (Kenney *et al.*, 1983), sirve también para determinar la dosis de inseminación para maximizar la eficiencia reproductiva de los sementales utilizados en los programas de inseminación artificial (Pickett & Voss, 1972). Este número resulta de la multiplicación del número de espermatozoides con motilidad progresiva por el número total de espermatozoides del eyaculado.

Algunos métodos fueron descritos para estimar objetivamente la motilidad de los espermatozoides, como la fotomicrografía (Van Huffel *et al.*, 1985), video micrografía (Varner *et al.*, 1991a), espectrofotometría (Jasko *et al.*, 1989), análisis computarizado (Amann & Pickett, 1987) y el método subjetivo de examen visual, siendo este realizada por una persona con experiencia (Varner *et al.*, 1991b).

Hay relatos de que las características seminales pueden estar altamente correlacionados con datos de fertilidad de sementales. Van Duijn & Hendrikse (1968) demostraron una gran correlación entre la concentración espermática y la validación subjetiva del porcentaje de los espermatozoides móviles. Las muestras con altas concentraciones espermáticas resultaban en validaciones con altos porcentajes de espermatozoides móviles. De la misma forma el pH del eyaculado que es influenciado por la concentración y por la composición del diluyente, puede afectar la validación subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles (Van Duijn & Hendrikse, 1968).

Para mejorar la validación de la motilidad muchos investigadores también utilizan diluyentes de semen con tasas de dilución 1:2. Los diluyentes de semen previenen la aglutinación y reducen la influencia de concentración del pH seminal sobre la validación subjetiva de la validación (Mattos, 1995; Keller, 1998; Lagares *et al*, 2000).

Funcionalidad de la membrana – Test Hiposmótico.

El test hiposmótico comenzó a ser utilizado para evaluar la función de la membrana plasmática y la capacidad de fertilización de espermatozoides humanos. Sin embargo, las soluciones hiposmóticas también han sido utilizadas para evaluar los espermatozoides equinos (Nie & Wensel, 2000).

Una de las grandes características de la membrana plasmática de cada espermatozoide es su capacidad de permitir el transporte de moléculas seleccionadas, que hacen que ocurra un edema de cada esperma en presencia de una solución hiposmóticas quedando la membrana funcionalmente intacta (Drevius, 1972). Esta característica de redondiamiento de cada una fue observada en espermatozoides bovinos en el microscopio (Drevius, 1972; Eriksson, 1966). A partir de los datos observados, Jeyedran *et al.* (1984) desarrollo el test hiposmótico, teniendo como objetivo evaluar la integridad funcional de membrana de los espermatozoides humanos cuando son sometidos a una solución hiposmótica conteniendo fructuosa y citrato de sodio a 150 mOsm/l, y obteniendo como resultado un gran número de células redondias. Las observaciones eran estudiadas por el redondiamiento de cada uno de los espermatozoides en el microscopio de fases.

Cuando la célula espermática es expuesta a un medio hiposmótico, ocurre un pasaje de agua por la membrana plasmática a su interior, como tentativa de restablecer el equilibrio osmótico entre el medio intra y extracelular (Drewis &

Eriksson, 1966). El pasaje de agua al interior de la célula provoca un aumento de su volumen.

El aumento de volumen por la edematización del espermatozoide es particularmente visible en la cola, pues la membrana plasmática que lo envuelve parece estar más fuertemente adherida en la cabeza. Estas alteraciones son visibles en el microscopio de contraste de fases. Según Jeyendran *et al.* (1984), es posible relacionar el redondamiento de cada uno con un buen funcionamiento de la cabeza, habiendo una buena correlación positiva entre colas redondeadas y penetración del espermatozoide en oocitos de hámster. Drewius & Eriksson (1966) observó que espermatozoides de toro, ratón, y hombre, suspendidos en solución salina y solución de Ringer, producían vesículas en la cola (edematización osmótica). La capacidad de la cola espermática edematizada en presencia de solución hiposmótica demuestra que el transporte de agua a través de la membrana, que ocurre normalmente, implica función intacta de membrana. Para evitar el estrés, el medio osmótico ideal debe causar aumento del volumen de la célula, sin causar lisis de membrana celular.

Integridad de membrana – Di acetato de Carboxifluoreceína (CFDA) e yodato de propidio (PI)

La prueba con coloración fluorescente han sido desarrollados para evaluar la integridad de membrana plasmática. Garner *et al.* (1986) describe el uso de las coloraciones fluorescentes, el di acetato de carboxifluoreceína e yodato de propidio, para evaluar la integridad de la membrana plasmática de suinos, bovinos, caninos, equinos y humanos.

La membrana plasmática íntegra es permeable al CFDA, que se transforman, en el interior de la célula por la acción de esterasas no específicas, en carboxifluoreceína libre fluorescente, esta es retenida en el interior de células

cuyas membranas están integras (Harrison & Vickers, 1990), con coloración verde fluorescente durante un máximo de 30 minutos (Haugland, 1992).

El uso aislado del colorante CFDA es un buen para observar daños de membrana plasmática y se ha comparado separadamente, el PI es considerado un colorante seguro (Baltes, 1993), siendo la combinación de los dos colorantes PI y CFDA más indicada que el uso aislado de ambos (Harrison & Vickers, 1990).

La única desventaja de la técnica de coloración fluorescente es la necesidad de realizarla lo más rápido posible después de la aplicación del colorante, pues la coloración se pierde debido al paso de los compuestos fluorescentes a través de la membrana (Johnson *et al.*, 1996). Esta técnica fue comparada con la microscopia electrónica por Eriksson & Rodriguez - Martinez (1996), confirmando la seguridad de su utilización para monitorear la integridad de membrana.

Factores que afectan la conservación del semen en medio líquido.

Calidad del semen.

Varios parámetros deben de ser analizados cuando el semen es utilizado para la inseminación artificial: 1) El volumen, 2) La concentración, 3) El número de espermatozoides con motilidad progresiva, 4) El número total de espermatozoides en el eyaculado, 5) El número de espermatozoides con morfología normal.

Para maximizar el número de espermatozoides con morfología normal y buena motilidad, el semen del semental debe ser recolectado con más frecuencia, sin embargo el intervalo de recolecta dependerá de la calidad del semen de cada individuo. Si el semental presenta menos del 50% de células espermáticas con una motilidad progresiva, 50% de espermatozoides morfológicamente normales, el eyaculado dada es considerado bueno para los programas de inseminación con semen refrigerado y congelado (Samper, 2000).

Volumen de concentración espermática.

El uso de semen refrigerado y congelado requiere de diluyentes adecuados para mantener una buena motilidad en el congelamiento o en el transporte espermático (Demick *et al.*, 1976; Pickett *et al.*, 1974; Varner *et al.*, 1987; Varner *et al.*, 1989).

La dilución del semen resulta en una reducción de la concentración espermática. Sin embargo para obtener una buena fertilidad también ha sido recomendada la inseminación con 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva (Pickett *et al.*, 1974; Pickett *et al.*, 1975; Demick *et al.*, 1976).

Inseminaciones de grandes volúmenes de semen diluido (100ml) también afectan la fertilidad de las yeguas, en base en los resultados de recolectas de embriones. Este efecto puede estar asociado a las inseminaciones realizadas con un número insuficiente de espermatozoides con motilidad progresiva. Sin embargo, verificando que se insemine con el mismo número de espermatozoides con motilidad progresiva en un volumen menor no mostraran baja fertilidad (Squires *et al.*, 1989; Rowley *et al.*, 1990).

La inseminación de pequeños volúmenes (10ml) y de bajas concentraciones espermáticas no están asociadas con baja fertilidad, probando que hay un número suficiente de espermatozoides para que ocurra la fertilización (Pickett *et al.*, 1975). Por otro lado existen registros de inseminaciones con grandes volúmenes (100ml) mas diluyente resultando en baja fertilidad en todas las yeguas que han sido inseminadas con un número adecuado de espermatozoides, demostrando que hay un efecto directo entre el volumen utilizado y la fertilidad (Squires *et al.*, 1989; Rowley *et al.*, 1990).

Cuando se utiliza semen congelado se debe tener un buen control folicular, las inseminaciones podrían ser realizadas prácticamente en el momento de ovulación,

utilizándose pequeñas dosis (0.5ml) y obteniéndose buenos índices de preñes. Sin embargo algunos autores prefieren volúmenes de inseminación entre 0.6 a 26 ml los cuales no presentan riesgos en la fertilización (Pickett *et al.*1987), más que el volumen inseminado 100 ml pueden ser perjudicial para la fertilidad (Rowley *et al.*1990). También haciendo inseminaciones con volúmenes mayores o iguales a 100 ml no presentan ventajas debido a que en la mayoría del volumen es perdido en aquellas yeguas que presentan el cérvix bien relajado durante la inseminación.

En programas de inseminación artificial las yeguas son inseminadas generalmente con 250 a 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Las tasas de fertilidad en yeguas inseminadas 50 millones de espermatozoides progresivos son bajas (37% de preñes por ciclo) y requieren más ciclos por yegua en relación a las yeguas inseminadas con 500 millones de espermatozoides progresivos (75% de preñes por ciclo) (Householder *et al.*, 1981). En condiciones ideales los espermatozoides pueden ser reducidos a 100 millones de espermatozoides progresivos sin reducir la fertilidad mas esto solo debe de ser realizados con sementales con alta fertilidad (Pickett *et al.*, 1975; Kenney *et al.*, 1976; Demick *et al.*, 1976).

Muchos estudios fueron utilizados para verificar las tasas de dilución benéficas en el semen equino Jasko *et al.* (1991) Relatan que a pesar de la concentración final la relación ha sido 50×10^6 espermatozoides/ml, pajuelas de semen mas concentradas con tasas de dilución mayores 1:2 (Semen: Diluyente) para alcanzar la concentración podrían mantener velocidad y motilidad espermática mejores, que aquellas pajuelas que presentan diluciones menores (<1:2), siendo la motilidad sumamente controlada durante 24 horas después de la dilución. Los mismos autores verifican que la concentración final de plasma seminal de 5 a 20%, frecuentemente obtenida cuando se diluía el semen en una concentración final de 25×10^6 espermatozoides/ml, es capaz de mantener la motilidad de semen refrigerado durante 72 horas cuando son utilizadas en tasas de dilución 1:4 y 1:19 (semen: diluyente).

Refrigeración del Semen.

En 1776 un Italiano Lazzaro Spallanzani, Reconocido como el padre de la inseminación, utilizó el semen de un semental para observar los efectos de la refrigeración del espermatozoide en el semen equino, él observó que los espermatozoides refrigerados retardaban sus actividades y que después de la exposición a un ambiente normal por un periodo de tiempo retomaban su motilidad (Bowen, 1969). Sin embargo el rápido enfriamiento de los espermatozoides puede causar daños irreversibles (Watson, 1981). Por otro lado, curvas de enfriamiento adecuadas pueden permitir el almacenamiento de espermatozoides por un largo periodo de tiempo. (Mattos, 1995, Keller, 1998, Meirelles, 1998; Lagares, 2000).

En cuanto más baja sea la temperatura de almacenamiento más lenta debe ser la tasa de enfriamiento, lo que determinará que la célula espermática se mantenga con vida (Pickett, 1993). Sin embargo Douglas-Hamilton *et al.* (1984) compararon muestras de semen refrigerado en cuanto a motilidad. Porcentajes de muestras de espermatozoides a distintas velocidades de enfriamiento, concluyendo que el enfriamiento rápido (10C/min) causa efectos que deterioran la motilidad e integridad de la membrana en relación al enfriamiento lento (0,30C/min). Este resultado también fue encontrado por Varner *et al.* (1988).

Choque Térmico.

Entiéndase por choque térmico las alteraciones morfológicas e irreversibles de la membrana celular inducidas por el enfriamiento rápido de los espermatozoides entre 20 °C a 5 °C (Watson, 1981; Watson, 1990).

La susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico es variable entre las especies. El semen de suidos, bovinos, carneros y equino presentan gran sensibilidad al choque térmico en cuanto al semen del gato, rata y humano presentan mayor resistencia al choque térmico (Watson, 1981).

El choque térmico causa daños irreversibles a los espermatozoides. Provocando un patrón anormal de la motilidad (circular e retrogrado), pérdida rápida de la motilidad y de la viabilidad, daños en la membrana plasmática e acrosoma, metabolismo reducido y pérdida de los componentes intracelulares (Graham, 1996). Estudios revelan que el acrosoma, en particular, es bastante afectado por el choque térmico (Pursel *et al.*, 1972), ocasionando un aumento de membrana acrosomal. El daño celular puede afectar las estructuras celulares (ruptura de las membranas) directamente o indirectamente, provocando alteraciones de las funciones celulares (disminuyendo los procesos metabólicos) (Watson, 1990). La temperatura crítica en la cual el espermatozoide equino es más susceptible al choque térmico va de los 19 C a 8 C (Moran *et al.*, 1992). El enfriamiento rápido de los espermatozoides provoca el choque térmico, sin embargo el enfriamiento lento no elimina del todo el problema (Watson, 1990).

La composición lipídica especialmente los fosfolípidos y el colesterol de las membranas celulares de los espermatozoides, son importantes para su función, una vez que los lípidos contribuyen con sus características físicas, los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide están dispuestos de forma laminar a temperatura corporal con movimiento corporal libre lo que determina su fluidez (Quinn, 1985), presentándose funcionales en estado líquido. De la temperatura corporal a la temperatura de refrigeramiento la membrana pasa de un estado líquido a un estado de gel, debido a que el cambio de estado de los lípidos es a temperaturas específicas, los grupos de lípidos en estado de gel se unen en una membrana blanda líquida formando brechas permeables los mismos que pueden llevar a la ruptura o a la fusión de la membrana (Amann & Graham, 1993).

Para minimizar el choque térmico se adicionan protectores y diferentes métodos de enfriamiento han sido utilizados (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984; Province *et al.*, 1985; Varner *et al.*, 1988; Moran *et al.*, 1992).

Diluyentes de Semen

Los diluyentes de semen son soluciones destinadas a proteger los espermatozoides de condiciones ambientales desfavorables y prolongar su supervivencia (Pickett & Amann, 1987; Brinsko & Varner, 1992). Estos también son utilizados para aumentar la viabilidad del semen de sementales subfértiles (Blanchard *et al.*, 1987), aumentar el volumen de la dosis inseminada (Pickett & Amann, 1987) y ayudar a las valoraciones de semen (Kenney *et al.*, 1983).

En estudios en los que se muestra las comparaciones entre diluyentes para verificar su capacidad de prolongar la vida espermática, el animal y una fuente verificativa de variación (Back *et al.*, 1975; Province, 1984). Por tanto ningún diluyente sería ideal para todos los sementales (Pickett & Amann, 1987).

El diluyente debe poseer ingredientes que son característica necesarias para que los espermatozoides tengan una mejor y mayor supervivencia.

1. Presión osmótica compatible con los espermatozoides.
2. Equilibrio adecuado de elementos minerales.
3. Una combinación adecuada de nutrientes.
4. Sustancias capaces de neutralizar productos tóxicos producidos por los espermatozoides.
5. Elementos que protejan a los espermatozoides de variaciones de temperatura (choque térmico).
6. Elementos que estabilicen el sistema enzimático de los espermatozoides.
7. Elementos que estabilicen la integridad de la membrana (Pickett, 1993).
8. Estar libres de organismos infecciosos.

La osmolaridad del semen de semental es equivalente 300 mOsm/l (Pickett *et al.*, 1976). La osmolaridad de los diluyentes a base de leche debe estar entre 300 a 400 mOsm/l, siendo así la osmolaridad óptima 350 mOsm/l (Varner *et al.*, 1991). Para llegar a una osmolaridad óptima es necesario que se haga una combinación adecuada de los ingredientes de los diluyentes.

Los espermatozoides del semental producen productos tóxicos como el ácido láctico, la adición de soluciones tampón en los diluyentes pueden prolongar la motilidad espermática.

El pH de los diluyentes de semen de semental puede variar entre 6.7 y 7.2 sin afectar la viabilidad espermática durante el almacenamiento (Brinsko & Varner, 1992).

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio:

El presente trabajo investigativo es un estudio experimental - cualitativo.

Ubicación del estudio:

Cortijo el Rosario, km. 134 carretera a Corinto.

Población:

La Población de Sementales maduros y aptos para la reproducción es de 36 de los cuales se utilizan entre 6 u 8 sementales para la reproducción debido a intereses propios de la crianza.

Muestra y Selección de los sementales:

La selección fue por conveniencia se seleccionaron 6 sementales a los cuales se les extrajeron dos eyaculados (para asegurar que por lo menos 1 sea viable para el estudio) a cada uno. Fueron seleccionados por poseer las características más apreciadas por los criadores y comercializadores de caballos como son: tamaño, doma, movimiento, conformación muscular, pureza, carácter, etc.

Metodología:

En cada eyaculado se utilizaron tres tipos de diluyentes, se sometieron al proceso de crio-conservación, luego se descongelaban y se les realizaban los análisis para determinar cual diluyente era más efectivo en cada semental, se guardaban éstos y se descartaban los otros. En el registro de cada semental se anotó que reactivo que se debía utilizar con cada uno (el más apropiado para la crio-conservación del semen de cada equino).

Selección de la muestra:

Para seleccionar los eyaculados tomamos en cuenta:

Concentración mayor de 60×10^6 espermatozoides por ml.

Motilidad progresiva mayor de 35%.

Todas las muestras examinadas que cumplieron con estas especificaciones fueron las utilizadas para las pruebas subsiguientes en la realización de este estudio, las que no cumplieron con estos parámetros fueron descartadas y eliminadas.

Criterios intrínsecos:

Los equinos en estudio son de las razas Pura Sangre Española y Pura Sangre Lusitana consideradas valiosas para su cría y reproducción.

Criterios extrínsecos:

La finca en que se realizó este estudio, se dedica a la crianza de caballos de razas puras Española y Lusitana y a su comercialización por lo cual tiene interés en la creación de un banco genético para protección tanto monetaria como del semental lo que le permitiría seguir obteniendo crías de un semental importante en caso de que este se encuentre inhabilitado para ejercer el acto reproductivo o incluso que no tenga vida. Además de la venta de dosis seminales a otros criadores interesados en un semental de la crianza.

Factores de exclusión:

Sexo (hembras).

Edad (potros).

Calidad del semen producido.

Poca importancia reproductiva.

Fuente de datos:

Para no obtener resultados negativos en la crío conservación de semen equino en los diferentes estudios se recomienda los siguientes estándares en la selección de los eyaculados:

- Concentración mayor de 60×10^6 espermatozoides por ml.
- Motilidad progresiva mayor de 35%.

Todas las muestras examinadas que cumplieron con estas especificaciones fueron las utilizadas para las pruebas subsiguientes en la realización de este estudio, las que no cumplieron con estos parámetros fueron descartadas y eliminadas.

Ventajas:

Este estudio nos permite valorar con cuál de los diferentes reactivos utilizados en el experimento reacciona mejor cada uno de los diferentes sementales lo que nos permite la crío conservación del semen y facilita mantener índices mayores de motilidad progresiva lo que se traduce en porcentaje de fertilidad de los diferentes eyaculados para la creación de un banco genético.

Limitaciones:

Altos costos.

Necesidad de importar reactivos no disponibles en el país.

Análisis de los datos:

Los análisis de los datos fueron realizados con un video microscopio con ambientador integrado los cuales fueron realizados por un profesional especializado en reproducción animal y con mucha experiencia en estos procedimientos en los cuales se tomaba en cuenta la motilidad progresiva de cada eyaculado.

Material y Método.

I-RECOLECCIÓN DEL SEMEN.

Una vez seleccionados los sementales se les realizó la inspección clínica para asegurarse de que estos se encontraran en buen estado de salud y aptos para la reproducción.

Debido a las características climatológicas del lugar donde se realizó el estudio se acordó que la hora óptima para la recolección del semen era por la mañana a partir de las 6:00 am a 8:00 am. O por la tarde a partir de las 4:00 pm.

Materiales.

- Vagina artificial
- Gel no espermicida.
- Protector de vagina.
- Papel filtro.
- Guantes.
- Biberón para la recolección de semen.
- Agua.
- Burro de cuero o yegua viva.
- Jabón.
- Papel toalla.

Procedimiento.

1) Elección y acondicionamiento del sitio donde se realizará la extracción del semen.

2) El semental debe ser expuesto a una yegua en celo durante 10 minutos; esta es una fase de cortejo para aumentar la cantidad de eyaculado y la cantidad y calidad de los espermatozoides.

3) Atar adecuadamente a la yegua de las extremidades posteriores en el lugar destinado para la extracción de semen. Es necesario tomar estas medidas para evitar que la yegua pueda lastimar al semental y para provocar la monta. Una vez que el semental está entrenado puede remplazarse la yegua por un burro de cuero.

4) Cuando el pene del semental se encuentra erecto se lava con agua y jabón; se enjuaga abundantemente, esto se hace con el objetivo de disminuir los niveles de contaminación y evitar que ésta tenga algún tipo de efecto negativo sobre la calidad del eyaculado. Cuando se considera que el pene se encuentra limpio se procede a secar con papel toalla con cuidado de no lastimar al semental y de manera que no queden residuos de agua tanto a nivel del pene como del abdomen del semental. Debe utilizarse guantes al realizar este procedimiento.

5) Se procede a la preparación de la vagina artificial utilizando el protector especial de vagina y el papel de filtro para evitar que el semen se mezcle con el gel utilizado como lubricante. Se inserta el biberón recolector de semen a una temperatura de 37 °C que es la temperatura de semental ya que los cambios bruscos en la temperatura del eyaculado afectan su calidad. Se utiliza agua caliente para darle esta temperatura y una presión que sea la suficiente para estimular al semental y que permita el paso rápido del eyaculado de la vagina al biberón recolector de semen.

6) En el momento que el caballo monta a la yegua o al burro de cuero se toma el pene con la mano para evitar que penetre a la yegua y se coloca en la vagina artificial, ésta debe sostenerse de manera que asemeje la posición de la vagina de la yegua hasta el momento en que el semental esta eyaculando y termine la eyaculación, para saber esto se colocan los dedos de la otra mano en la base del pene para sentir las pulsaciones y de esta manera bajar apropiadamente la vagina en el momento preciso y retirarla con cuidado de no perder el eyaculado.

7) Se retira el biberón recolector de semen cuando todo el producto de la eyaculación se encuentra en él, protegiéndolo de los factores ambientales que puedan afectarlo y se transporta al laboratorio lo más rápidamente posible. Los factores que pueden afectar la calidad del semen son entre otros: la luz, los cambios de temperatura, golpes y contaminantes como el polvo, agua, jabón y microorganismos que puedan entrar en contacto con la muestra.

Observaciones de las características de los diferentes eyaculados:

Resultados obtenidos:

Hípico.

02/03/2011.

Hora	6:20 am
Volumen	70 ml
Motilidad Total	70%
Motilidad progresiva	60%
Concentración	85.9×10^6
Espermatozoides totales	$6013 \times 10^6/\text{ml}$

Hípico.

14/03/2011.

Hora	7:30 am
Volumen	90 ml
Motilidad Total	70%
Motilidad progresiva	60%
Concentración	91.3×10^6
Espermatozoides totales	$8217 \times 10^6/\text{ml}$

Liceo.

02/03/2011.

Hora	7:10 am
Volumen	110 ml
Motilidad Total	60%
Motilidad progresiva	35%
Concentración	112×10^6
Espermatozoides totales	$12320 \times 10^6/\text{ml}$

Liceo.

11/03/2011.

Hora	6:30 am
Volumen	50 ml
Motilidad Total	70%
Motilidad progresiva	50%
Concentración	158×10^6
Espermatozoides totales	$7900 \times 10^6/\text{ml}$

Ultramar.

05/03/2011.

Hora	4:30 pm
Volumen	20 ml
Motilidad Total	80%
Motilidad progresiva	70%
Concentración	151×10^6
Espermatozoides totales	$3020 \times 10^6/\text{ml}$

Ultramar.

08/03/2011.

Hora	4:10 pm
Volumen	83 ml
Motilidad Total	85%
Motilidad progresiva	65%
Concentración	99.4×10^6
Espermatozoides totales	$8250 \times 10^6/\text{ml}$

Valiente.

06/03/2011.

Hora	4:20 pm
Volumen	115 ml
Motilidad Total	45%
Motilidad progresiva	35%
Concentración	70.3×10^6
Espermatozoides totales	$8084 \times 10^6 / \text{ml}$

Valiente.

09/03/2011.

Hora	6:20 am
Volumen	50 ml
Motilidad Total	70%
Motilidad progresiva	60%
Concentración	103×10^6
Espermatozoides totales	$5150 \times 10^6 / \text{ml}$

Libertado.

03/03/2011.

Hora	6:50 am.
Volumen	120 ml
Motilidad Total	60%
Motilidad progresiva	35%
Concentración	128x10 ⁶
Espermatozoides totales	15360x10 ⁶ /ml

Libertado.

06/03/2011.

Hora	7:40 am
Volumen	125 ml
Motilidad Total	50%
Motilidad progresiva	35%
Concentración	60x10 ⁶
Espermatozoides totales	7500x10 ⁶ /ml

Naviero.

06/03/2011.

Hora	7:40 am
Volumen	85 ml
Motilidad Total	45%
Motilidad progresiva	45%
Concentración	60×10^6
Espermatozoides totales	$5100 \times 10^6 / \text{ml}$

Naviero.

15/03/2011.

Hora	4:50 pm
Volumen	130 ml
Motilidad Total	50%
Motilidad progresiva	50%
Concentración	76×10^6
Espermatozoides totales	$9880 \times 10^6 / \text{ml}$

II- Crio conservación del semen.

Materiales.

- Fotómetro y macro cubetas.
- Tubos falcón.
- Micro pipetas.
- Puntas azules y amarillas.
- Centrifuga.
- Baño maría.
- Nitrógeno líquido.
- Termos para nitrógeno líquido.
- Racks.
- Autoclave.
- Ajustador magnético.
- Imanes.
- Colchón de centrifugación.
- Pajuelas de 0.5 ml.
- Maquina marcadora de pajuelas.
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitados.
- Incubadora
- Video Microscopio.
- Refrigeradora.
- Caja de poroplás
- Diluyente para semen.

Procedimiento.

- 1) Asegurar que las condiciones del laboratorio sean las adecuadas para realizar los diferentes procedimientos. (Todos los instrumentos deben estar estériles, el laboratorio debe estar lo más limpio posible y la temperatura de 22⁰ C.)
- 2) Se traslada el eyaculado del biberón recolector de semen a un vaso de precipitado graduado estéril y atemperado para medir su volumen.
- 3) Utilizando una micro pipeta con punta amarilla se toman 5 micro litros de semen y se colocan en una macro cubeta con 1900 micro litros de Lactato de ringer y se coloca la macro cubeta en el fotómetro para medir la concentración del semen, calibrado para semen de equino.
- 4) Mezclar el semen con el diluyente hasta llevarlo a una concentración que facilite su transporte y que lo sostenga lo suficiente antes del centrifugado.
- 5) Con la pipeta Pasteur se le agrega un colchón especial que posee una densidad mayor que la del semen para que amortigüe el efecto de la fuerza centrípeta sobre el eyaculado y evite el maltrato mecánico sobre los espermatozoides.
- 7) Se coloca la muestra en la centrifugadora por 15 minutos a una velocidad de 800g.
- 8) Una vez terminado el tiempo se retira el noventa por ciento del plasma seminal utilizando una macro pipeta y también se retira el colchón utilizando la pipeta Pasteur.
- 9) Diluir los espermatozoides con los diluyentes específicos para su crio-conservación, llevándola hasta una concentración cercana o mayor a 50 X 10⁶.

10) Se llenan las pajuelas de 0.5 ml. previamente rotuladas con el nombre del semental, número de chip, raza, diluyente utilizado y otros datos que se consideren necesarios, haciendo uso de la peineta o de la máquina embazadora y se sellan con alcohol polivinílico.

11) Se colocan las pajuelas en unas racks o en unas gradillas utilizando el menor tiempo posible.

12) Llevar las pajuelas a refrigeración durante dos horas a una temperatura de 5 grados centígrados.

13) Una vez transcurridas las dos horas se colocan los racks en el recipiente de poroplás que contiene nitrógeno líquido, se colocan las pajuelas a 5 cm Sobre el nivel del nitrógeno, durante 15 minutos para que la temperatura baje 60 grados por minuto luego se colocan las pajuelas directamente en el nitrógeno líquido.

14) Marcar los contenedores para pajuelas, con la fecha y el nombre del semental, sumergirlos en el nitrógeno líquido y agregar las pajuelas del semental con el cual fueron marcadas y trasladarlos a los termos de nitrógeno líquido y sellar.

III- COMPROBACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Materiales:

- Video Microscopio.
- Porta objetos.
- Cubre objetos.
- Baño maría.
- Micro pipeta.
- Puntas amarillas.
- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Incubadora.

Procedimiento:

- 1) Trasladar el termo de nitrógeno líquido al laboratorio en donde se encuentre el microscopio o video microscopio.
- 2) Tomar una pajuela de cada uno de los diluyentes utilizados y colocarlas en el baño maría por un minuto a una temperatura de 37 °C.
- 3) Trasladar el contenido de las pajuelas a los tubos de ensayo que se encuentran a una temperatura a los 37 °C.
- 4) Colocar una gota de la muestra de 5 micro litros en el porta objeto que se encuentre a temperatura adecuada utilizando una micro pipeta de punta amarilla y cambiando la punta entre cada eyaculado.
- 5) Extender la gota con un cubre objeto.
- 6) Observar las características del eyaculado.

7) Observar las muestras de cada eyaculado con los diferentes diluyentes en el video microscopio para comparar la motilidad progresiva y decidir cuál de los diluyentes conserva mejor esta característica.

Diluyentes utilizados: nuestra base fue el diluyente INRA al que se le agregaron los diferentes componentes para formar diluyentes adecuados para la crio conservación deben emplearse siempre sustancias puras y equipos limpios a fin de excluir materiales tóxicos del ambiente . Los agentes que constituyen buenos medios de dilución realizan las siguientes funciones:

- Aportan nutrientes como fuente de energía generalmente glucosa y fructosa.
- Protegen contra los efectos nocivos del enfriamiento rápido. (metil formamida, dimetil formamida, glicerol.) y evitan que se formen cristales dentro de la membrana de los espermatozoides.
- Son amortiguadores que evitan cambios perjudiciales en el Ph. al formarse el ácido láctico.
- Contiene antibióticos. (Tilosina, Gentamicina, Espectomicina.) lo que no permite el crecimiento de diferentes microorganismos que puedan afectar la fertilidad del eyaculado.
- Poseen alta solubilidad.

Seleccionamos los siguientes diluyentes:

a) **Glicerol:** Se prepara con 200 ml. De medio INRA al que se le agregan 2.5% de yema de huevo y 3.5% de glicerol. Por lo cual se agregan 5.3 ml de yema de huevo y 7.42 de glicerol para obtener 212 ml. De solución con las concentraciones indicadas.

b) **Dimetil Formamida:** Se prepara con 200 ml. De medio INRA al que se le agregan 2.5 % de yema de huevo, 2.5% de Dimetil formamida y 1% de glicerol. Se agregan 5.3 ml de yema de huevo, 5.3 ml de dimetil formamida y 2 ml de glicerol. Para obtener 212 ml de solución con las concentraciones recomendadas.

c) **E-Z^R Mixin.** Diluyente comercial.

El medio INRA es un diluyente comercial, la yema de huevo aporta los nutrientes y el glicerol actúa como crio-protector, es decir evita el enfriamiento rápido.

Resultados Post crio conservación:

Los resultados obtenidos en nuestro experimento es que cada uno de los distintos diluyentes logra mantener la motilidad progresiva de los diferentes eyaculados con diferentes escala; motilidad progresiva baja (- -), motilidad progresiva media (-) y motilidad progresiva alta (+).

El diluyente que conservo mejor la motilidad progresiva de los diferentes eyaculados fue el que contenía dimetil formamida ya que ocho de los eyaculados reaccionaron mejor con este equivalente al 66.67% y en los otros cuatro eyaculados manteniendo la motilidad pero no con motilidad progresiva alta, dos eyaculados reaccionaron con el diluyente que contenía glicerol equivalente al 16.67% en los otros diez eyaculados logro mantener la motilidad progresiva y dos eyaculados con el diluyente comercial E – Z Mixin^r equivalente al 16.67% cabe destacar que en el resto de los eyaculados se observo una motilidad progresiva muy baja con este diluyente

Claves:

Signo + Motilidad progresiva.

Signo - Motilidad progresiva media.

El signo - - Motilidad progresiva baja.

Semental Hípico Pura sangre Española					
Dimetil Formamida.		E – Z.		Glicerol.	
02/03/2011	14/03/2011	02/03/2011	14/03/2011	02/03/2011	14/03/2011
+	+	--	--	-	-
+	+	--	--	-	-

Debido a los resultados obtenidos en las pruebas post - congelación se decidió que este semental debe ser conservado con el diluyente con dimetil formamida, los datos deben de ser agregado a su hoja de control reproductivo de este.

Semental Pura Sangre Española Naviero					
Dimetil Formamida		E -Z		Glicerol	
06/03/2011	15/03/2011	06/03/2011	15/03/2011	06/03/2011	15/03/2011
-	+	+	-	--	--
-	-	+	+	--	--
-	-	+	+	--	--
+	-	-	+	--	--
+		+		--	
+		+		--	

Por las pruebas post - descongelación se determino que este semental debe de ser crio conservado con el diluyente E-Z^r. Cabe destacar que este semental no nos dejo nada en claro hasta las segunda prueba debido a que en la primera variaba entre dimetil formamida y E-Z^r.

Cabe destacar que se pueden hacer diferentes pruebas con otros diluyentes para comparar si alguno da un resultado igual al E-Z^r o crear uno que asemeje a las características de este.

Semental Pura Sangre Lucitana Ultramar					
Dimetil Formamida		E - Z		Glicerol	
05/03/2011	08/03/2011	05/03/2011	08/03/2011	05/03/2011	08/03/2011
-	-	--	--	+	+
-	-	--	--	+	+
-	+	--	--	+	-

Debido a las pruebas pos descongelado se decidió que este semental sea crio conservado con el diluyente con glicerol.

Semental Pura Sangre Lusitana Valiente					
Dimetil Formamida		E - Z		Glicerol	
06/03/2011	09/03/2011	06/03/2011	09/03/2011	06/03/2011	09/03/2011
+	+	--	--	-	-
+	+	--	--	-	-
+	+	--	--	-	-

Este semental demostró una gran afinidad al diluyente compuesto con dimetil formamida y se decidió su preservación con este.

Semental Pura Sangre Española Liceo.					
Dimetil Formamida		E - Z		Glicerol	
02/03/2011	11/03/2011	02/03/2011	11/03/2011	02/03/2011	11/03/2011
+	+	--	--	-	-
+	+	--	--	-	-
+	+	--	--	-	-

Debido a las pruebas realizadas en los eyaculados se decidió que este semental fuera crio conservado con el diluyente con dimetil formamida.

Semental Pura Sangre Española Libertado					
Dimetil Formamida		E - Z		Glicerol	
03/03/2011	06/03/2011	03/03/2011	06/03/2011	03/03/2011	06/03/2011
+	+	--	--	-	-
+	-	--	--	-	+
+	+	--	--	-	-
	+		--	-	-
	+		--	-	-

Este semental no mostraba una clara diferencia ya que era muy poca por lo cual se hicieron una mayor cantidad de pruebas para decidir el diluyente con el que iba a ser conservado al final se decidió el que contenía dimetil formamida.

Discusión.

Los diluyentes y procedimientos que se utilizaron en el presente trabajo son similares a los descritos por diferentes investigadores del campo de la crio conservación en países pioneros en esta materia como: Magda Jochims Viera de la Universidad Federal de Rio de Janeiro Do Sul Facultad de Veterinaria y Dr. Ángel Vallesillos, investigador de la Universidad de Córdoba, España, entre otros.

Los resultados obtenidos en este experimento fueron similares a los presentados en las diferentes investigaciones documentadas recientemente, logrando mantener exitosamente la motilidad progresiva en los diferentes eyaculados.

A diferencia de los estudios anteriores en los que la mayoría de los eyaculados reaccionaban mejor con el diluyente que contenía glicerol y de los estudios investigativos del Dr. Ángel Vallesillos que obtuvo estos mismos resultados en Córdoba, en este estudio se observó que el diluyente que mejor funcionó con los eyaculados de los diferentes los sementales seleccionados fue el que contenía dimetil formamida, dado que el 66.67% de los eyaculados presentaron mayor motilidad progresiva en su post crio conservación cuando se utilizó este diluyente.

Cabe destacar que debido a las particularidades del semen equino es necesario que se realicen estas pruebas con cada uno de los sementales de los cuales se desee crear un banco genético. Estos resultados solo son aptos para los sementales del estudio realizado en el Cortijo el Rosario municipio de Chinandega.

Conclusiones.

Los resultados que obtuvimos con esta investigación fueron los siguientes:

- Los eyaculados de los sementales Hípico, Valiente, Libertado y Liceo reaccionaron conservando mejor la motilidad progresiva con el diluyente con dimetil formamida. Los eyaculados del padrote Ultramar dieron mejor resultado con el diluyente que contenía glicerol; Los eyaculados del semental Naviero reaccionaron mejor con E-Z^r Mixin que es un diluyente comercial.
- Con estos diluyentes es posible mantener la motilidad progresiva de los espermatozoides en la crio conservación de semen equino de las razas Pura sangre Española y Pura sangre Lusitana.
- Las pruebas deben ser realizadas en los eyaculados de cada caballo en el sitio donde se encuentra el semental, es decir, este estudio es válido solamente para El Cortijo El Rosario departamento de Chinandega.
- También concluimos que las pruebas realizadas hacen factible la creación de un banco genético en las instalaciones del Cortijo el Rosario.

RECOMENDACIONES.

- Dar un tiempo de recelo no menor de 10 minutos lo cual mejora la cantidad y calidad del eyaculado.
- Dejar descansar al semental un mínimo de tres días previos a la recolección seminal para no obtener eyaculados que no cumplan con los estándares para la crío conservación.
- Mantener la actividad sexual de los sementales o hacer recolectas paulatinamente para mantener la calidad de los eyaculados.
- Es muy importante verificar que las cantidades de químicos sean correctas debido a que el abuso o mal manejo de estos puede causar lisis a los espermatozoides.
- Diferenciar los eyaculados aunque sean del mismo semental y rotularlos para facilitar su manejo.

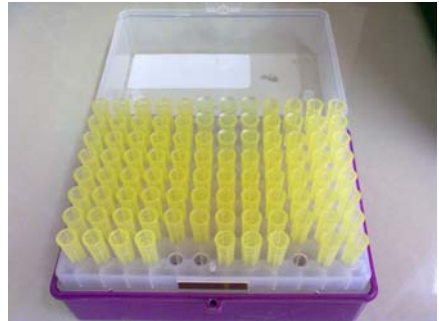
Bibliografía

1. Nishikawa, M. (1959): Estudios sobre la reproducción en caballos. Tokio Japan Racine Association.
2. Buell, J. R. (1963): A methodo for freezing stallion semen and test of its fertility. Vet. Rec.
3. Rajamannan, A. H. J ; Zemjanis, R. (1968): Freezen and fertility studies with stallion semen. Proceedings of international congress on animal reproduction and artificial insemination.
4. Nishikawa, Y ; Shinomiya, S. (1968): Studies on deep freezing of horse spermatozoa. Proceedings international congress on animal reproduction and artificial insemination. Vol 2.
5. Nishikawa, Y; Shinomiya, S. (1972): Freezability of horse semen collected during the non-breeding season. Proceedings international congress on animal reproduction and artificial insemination. Vol 2.
6. Pace, M. M ; Sullivan, J. J. (1975): Effect of timing of insemination, nubere of spermatozoa and extender component on pregnancy rate and mares inseminate with froze stallion semen. J.Reprod.Fertil. Suppl.
7. Nishikawa, Y. (1975): Studies on tha preservation of raw and frozen horse semen. J.Reprod.Fertil.Suppl.
8. Amann, R. P; Pickett, B.W. (1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.. J. Equiene Vet. Sci.
9. Rousset, H; Chabteloube, P; Magistrini, M; Pañmer, E. (1987): Assesment of fertility and semen evaluation of stallions. J. Reprod. Fertil. Suppl.
10. Bexudé, C. (1996): www.agroinformacion.com
11. www.theservier.com

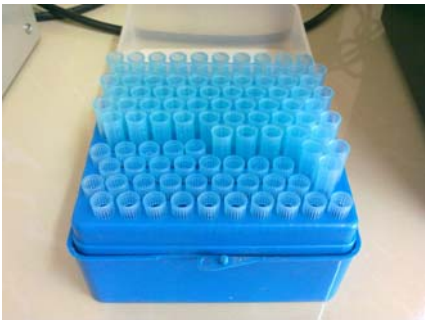
Anexos.



Encubadora o ambientadora.



Puntas amarillas.



Puntas azules.



Tubo falcon.



E-Z mixin.



INRA 96.



Vaso precipitado.



Cubre objetos.



Baño maria.



Peineta para embazar.



Videomicroscopio.



Micropipeta.



centrifuga.



Imanes.



Racks.



Escalera.



Alcohol polivinilico.



Marcador de pajuelas.