

168
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EFFECTO DEL SISTEMA DE ENVASADO Y LA CONCEN-
TRACION ESPERMATICA SOBRE EL DAÑO ACRO-
SOMAL Y LA MOTILIDAD POSTDESCONGE-
LACION DEL SEMEN DE EQUINO.



T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Armando Palacios Angola

Asesores: MVZ. DMV. Javier Valencia Méndez
MVZ. Ph D. Luis A. Zarco Quintero



México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	REVISION DE LITERATURA.....	2
	2.1. Ventajas del semen congelado.....	2
	2.2. Colección del semen.....	6
	2.3. Evaluación y congelación del semen.....	9
	3.4. Descongelación del semen.....	18
III.	MATERIAL Y METODOS.....	19
IV.	RESULTADOS.....	22
V.	DISCUSION.....	29
VI.	CONCLUSIONES.....	35
VII.	LITERATURA CITADA.....	36

I. RESUMEN

PALACIOS ANGOLA, ARMANDO. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad postdescongelación del semen de equino. (Bajo la asesoría del Dr. Javier Valencia Méndez y del Dr. Luis Zarco Quintero).

Se colectaron y congelaron durante el invierno 8 eyaculados de 5 sementales envasándolos en macrotubos de 4 ml y en pajillas de 0.5 ml, y a dos diferentes concentraciones, 100 y 800 millones de espermatozoides por ml. Posterior a la descongelación se evaluaron en microscopio de contraste de fases 300 espermatozoides por cada muestra en las que se determinó la morfología espermática con énfasis en el estudio del daño acrosomal, así como la motilidad. Los resultados indicaron que el efecto de la concentración espermática fue evidente. Cuando ésta fue mayor (800 mill/ml), independientemente del envase, la motilidad postdescongelación y el daño acrosomal se vieron menos afectados que al utilizar la concentración de 100 mill/ml ($P < 0.01$). Por otro lado, no se presentó variación en el porcentaje de normalidad espermática al ser sometidos los eyaculados al proceso de congelación ($P > 0.05$). Por lo anterior podemos concluir que este sistema de congelamiento de semen es beneficioso y perfectible utilizando dosis con altas concentraciones de espermatozoides en el envase.

I. INTRODUCCION

A pesar de las restricciones impuestas por las diferentes asociaciones de criadores de caballos la criopreservación de semen de equino para fines de inseminación artificial ha cobrado gran interés debido a la reducción de costos por concepción y a un mayor acceso al material genético.

Durante los últimos años se han efectuado numerosos trabajos los cuales fueron basados en las técnicas propuestas por Cochran y col. (6,7) de la Universidad Estatal de Colorado, o , por Martin y col. (33) de la Universidad de Hannover. Los primeros utilizan una concentración espermática alta (800 mill/ml) para envasar en pajillas de .5 ml ó 1 ml de capacidad, y los segundos usan una concentración espermática baja (100 mill/ml) para envasar en macrotubos de 4 ml.

Lo anterior permite pensar que la relación entre superficie de contacto con el exterior y volumen de semen es muy distinta en función del envase, lo que resulta en diferencias en el ritmo de congelación del semen, por lo que puede haber diferencias en el daño espermático al congelar semen en diferente tipo de envase. Es por ello que el objetivo de este experimento es determinar independientemente los efectos de tipo de envase y concentración espermática sobre el daño acrosomal y motilidad postdescongelación en el semen de equino tomando éstos como parámetros indirectos para estimar la fertilidad de un eyaculado criopreservado.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Ventajas de la criopreservación de semen

La criopreservación del semen de equino ha sido en los últimos años objeto de innumerables controversias, tanto en el orden legal y económico como en el científico. En contraste con la industria bovina, las regulaciones de las diferentes asociaciones de criadores de caballos han restringido los incentivos para encontrar mejoras en la técnica de inseminación artificial en esta especie usando semen congelado. En E.U.A. hay 40 asociaciones, de las cuales sólo 13 aceptan abiertamente la práctica de inseminación artificial con semen congelado (24,56). Aun así, viéndolo positivamente es un avance surgido hace solamente 10 años (2). Es por todo esto que la investigación en este campo es muy limitada, ya que el criador refleja poco interés y no hay suficiente soporte financiero; por ende, la consecución del óptimo aprovechamiento que conlleve a resultados satisfactorios no ha sido encontrado. No obstante, la necesidad de avance es mucho más manifiesta que hace 9 años (20,42,50), y quizás el ejemplo más concreto lo tienen los chinos, que desde 1980 hasta 1985 han inseminado 110,000 yeguas con semen congelado teniendo para ese último año una fertilidad de 68 % (2).

La criopreservación del semen implica el mantenimiento celular a temperaturas extremadamente bajas. Normalmente

se utiliza el nitrógeno líquido como medio de conservación, el cual proporciona una temperatura de - 196° C, lo que provoca una reducción casi absoluta de la actividad metabólica del espermatozoide; Este queda "suspendido en el tiempo" (56).

La criopreservación del semen de equino se desarrolla como una traslación de la técnica de la conservación del semen bovino (17,56). Así, ya desde 1956 se trabaja en la congelación del semen equino, obteniéndose en ese entonces logros pioneros en fertilidad entre el 33 % y el 80 % (4,17,19,25,38,40,41,42,48,49,64).

En el equino, la criopreservación de semen tiene como ventajas:

A) Reducir el transporte de los animales. Es más fácil y económico transportar un termo de nitrógeno líquido que un caballo. No se requiere transportar a la yegua, evitándose así el riesgo de accidentes, el costo de seguros y el estrés que puede influir directamente en la fertilidad. En caso de ser yegua recién parida se evita también el traslado de la cría (2,29).

B) Permite prolongar la vida reproductiva de un semental. Se facilita el acceso al material genético específico aun cuando el animal haya muerto, obteniendo porcentajes de sobrevivencia bastante altos, inclusive habiendo pasado muchos años desde su colección (2,24,28,29,56).

C) Hay menos pérdida de espermatozoides. Se incrementa el número de hembras a inseminar por la posibilidad de

diluir a la dosis necesitada. Se obtienen muchas más dosis por cada eyaculado, que utilizando la Inseminación artificial en fresco o la monta natural (44).

D) El seminal puede continuar con su vida productiva zootécnica sin que su vida reproductiva se detenga. Puede hacer ambas cosas al mismo tiempo (56).

E) Se puede hacer un análisis previo de la calidad del semen (29,56).

F) Permite efectuar un tratamiento preventivo al semen para minimizar la posibilidad de transmisión de organismos potencialmente patógenos (23,24,53).

La congelación de semen también presenta algunas desventajas, como son:

A) En la mayoría de los seminales hay una sensible reducción en la fertilidad del semen descongelado comparada con la del semen fresco (12,27,33).

B) Se requiere de equipo especializado para la conservación del semen, al igual que personal calificado para realizar la congelación del mismo.

C) La membrana espermática pierde estabilidad con el proceso de congelación - descongelación, produciendo en muchos casos un aceleramiento de la reacción acrosomal con lo que se libera la enzima acrosina. La liberación prematura de la acrosina es perjudicial debido a que esta enzima, necesaria para el acercamiento del espermatozoide, tiene un periodo de vida muy corto (2,29).

D) La necesidad de no arriesgar la fertilización de un ciclo estral, y la imposibilidad de palpar a la yegua con la frecuencia necesaria para determinar con exactitud cuando va a ocurrir la ovulación, hace que con este método se incrementen los servicios por concepción, situación que redundan en costos altos debido al encarecido precio de dichas dosis (56).

A lo largo de los años en que se ha implementado esta manera de conservación de semen de equino se han dictado normas y especificaciones sobre la técnica en sí mejorándose día con día tanto los ingredientes como las dosis y los procedimientos para congelar estas células. En este orden de ideas han surgido dos escuelas, una norteamericana y otra alemana, las cuales concuerdan en el procedimiento general, pero no así en el diluyente a utilizar ni en el sistema de envasado. La escuela de Colorado utiliza los postulados generados por Cochran y col. en 1983 (6,7) que en síntesis trabajan con un diluyente de centrifugación a base de citrato de sodio, y para congelar usan pajillas de 0.5 ml a una concentración espermiática por dosis de 800 millones/ml. La escuela de Hannover, por su parte sigue las indicaciones sugeridas por Martin y col. en 1979 (33) quienes utilizaron un diluyente de centrifugación a base de glucosa, envasado en macrotubos de 4 ml de capacidad y a una concentración espermiática de 100 millones/ml por dosis. En ambos casos la cantidad total de espermatozoides en la dosis es de 400 millones, que se consiguen en la escuela americana

con poco volumen de semen muy concentrado y en la escuela alemana con un mayor volumen pero menor concentración. Sin embargo, la relación entre superficie de contacto y volumen no es la misma para las dos presentaciones, ya que el macrotubo tiene menos superficie por unidad de volumen de semen que la pajilla. Es sabido que la transferencia de temperatura entre el semen y el medio ambiente es más rápida conforme aumenta la superficie (31,55,63), por lo que se deduce que el ritmo de congelación es diferente para las dos presentaciones, lo que resultará en diferentes patrones de cristalización, concentración de solutos, etc., durante el proceso de congelación.

Muy diversos son los trabajos que optan por uno u otro método tanto de diluyente como de envasado (20,27,30,32,35,61), sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado una investigación que confronte el sistema de envasado con respecto a la concentración a que se somete el eyaculado en cada envase, a excepción de un trabajo de Aukema en 1985 (3). Sin embargo él estudió dos concentraciones distintas a las frecuentemente utilizadas, por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar independientemente los efectos de tipo de envase y concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad postdescongelación en el semen de equino.

2.2. Colección de semen.

Aun cuando la calidad del semen postdescongelado no varía en función de la época del año que se recolecte (32), el hacerlo en época de invierno ha resultado de mejor provecho porque:

1) En época de invierno y con la temporada de monta ya finalizada, el semental se encuentra descansado, comprobándose que con estos periodos de descanso se incrementa significativamente el número total de espermatozoides por eyaculado (5,32).

2) El semen frasco recolectado en invierno está asociado con poco volumen de eyaculado, sobre todo de gel, y alta concentración espermática, siendo esto un factor favorable ya que no se necesita centrifugar tanto para poder obtener el paquete espermático. Es por lo anterior que se recomienda realizar la colección del semen para fines de congelación durante los meses de octubre a enero, mismos que fueron establecidos como periodo de investigación (5,24,32).

La selección de los sementales es el punto más importante a considerar para la obtención de eyaculados propios para su congelación, debido a que no todos son congelables, entendiéndose por congelable a aquella célula espermática capaz de permanecer viable después de la descongelación (29,35). Ante todo deben ser animales probadamente fértiles y que estén en óptimo estado nutricional y de salud. Antes de la colección, al animal

se le practica un examen genital externo, y se realiza un estudio del semen para determinar la capacidad de éste para ser congelado. Las características mínimas requeridas son:

A) Tener una motilidad progresiva inicial mayor al 50% (6,9,10).

B) Poseer una cantidad espermática total en el eyaculado de por lo menos 4×10^9 (5,8).

El proceso de obtención del semen comienza con el lavado y secado del pene erecto del semental para minimizar la contaminación en el eyaculado por exceso de carga bacteriana o desechos epiteliales. Es importante recordar que no se debe lavar repetidamente porque se remueve la flora local, facilitando el crecimiento de bacterias patógenas (56), de preferencia enjuagarlo con un algodón será suficiente. Estos mismos cuidados deben ser tomados para la limpieza de la yegua (56,58). Para colectar el semen se debe contar con cuidados extremos para evitar influencias medioambientales como luz, temperatura, shock químico y osmótico, o agitación excesiva que causen daños irreparables en el espermatozoide (56).

La colección del semen se hace por medio de una vagina artificial (V.A.), a la que se le adapta un filtro de gasas para retirar la fracción gel del eyaculado, así como cualquier cuerpo extraño (25,56). El retiro de esta fracción se debe a que tiene un efecto de aglutinación en los espermatozoides, lo que le impide movilizarse bien,

causando merma en el cálculo de la motilidad (44). Inmediatamente antes de la obtención del semen, la temperatura dentro de la V.A. debe ser de 44-48° C. Esto se consigue introduciendo la suficiente cantidad de agua caliente a la V.A. para obtener tanto la temperatura como la presión necesaria para proveer uniformidad de contacto a lo largo del pene (56). La superficie interna de la V.A. debe ser lubricada con un gel no espermatocida como puede ser la carboximetil celulosa, petrolato, glicerol, etc. (2,56). Una vez colectado el eyaculado hay que mantener una temperatura similar a la corporal durante el transporte del semen al laboratorio para evitar el shock térmico (56). Es esencial que los componentes, el equipo y materiales que entren en contacto directo con el pene y el semen no contengan sustancias espermatocidas. En el caso de que el material y equipo no sean desechables, deben ser lavados, secados y esterilizados cada vez que sean usados (2,24,56). Las mangas que utiliza la V.A. pueden ser lavadas sumergiéndolas en alcohol etílico o isopropílico por 2-24 h para desinfectarlas y secarlas al aire (56).

2.3. Evaluación y congelación del semen.

El procedimiento de congelamiento comienza midiendo el volumen total del eyaculado libre de gel. Después se retira una gota para calcular la motilidad inicial en el microscopio óptico (22), sobre una laminilla previamente calentada a 37° C. Otra gota del semen es mezclada con

solución Hancock modificada (22) para examinar con el microscopio de contraste de fases la morfología, y en especial el daño acrosomal de las células espermáticas (13,16). Las técnicas de dilución de las escuelas americana y alemana difieren en el tipo de diluyente de centrifugación a utilizar. Dentro de la escuela alemana, Martin et al (33) en el año 1979 describieron un método de centrifugación en el que usaba como diluyente una solución cuyos ingredientes son:

glucosa	59.985 g.
EDTA	3.700 g.
citrato sódico dihidro	3.699 g.
bicarbonato de sodio	1.200 g.
sulfato de polimixina B	10.6 u.i.
agua destilada c.b.p.	1 litro
pH	6.59
mOsm/Kg	409

Mientras que Cochran et al (6,7), de la escuela americana, desarrollaron un diluyente de centrifugación cuyos componentes son:

citrato de sodio dihidro	25.950 g
glucosa	1.500 g
EDTA disódico	3.699 g
bicarbonato de sodio	1.200 g
agua destilada c.b.p.	1 litro
pH	6.89
mOsm/Kg	290

Estos últimos autores asumieron que con esta solución de menor viscosidad (tiene menos concentración de solutos) se facilitaría la obtención del paquete espermático durante la centrifugación. Para evitar una precipitación

brusca de los espermatozoides al fondo del tubo de centrifuga ellos recomiendan colocar a manera de "colchón" 0.25 ml de la solución propuesta por Martin y col. (33) la cual es mas viscosa, permitiendo un traslado mas lento hacia el fondo del tubo durante la centrifugación. Un estudio posterior (59) ha comprobado que la omisión de este colchón no afecta la motilidad progresiva y si tiende a reducir el número de espermatozoides con daño acrosomal postdescongelación. Han sido numerosos los estudios que se han diseñado con el uso del método de Martin y col. (18,24,52,57,62) o del método de Cochran y col. (9,11,59,60). La razón por la cual el presente trabajo se basó en la técnica alemana fue porque estudios realizados han demostrado que el mayor porcentaje de motilidad postcentrifugación ($P < 0.05$) se encuentra en aquellas soluciones cuya presión osmótica está entre 300 y 400 mOsm/Kg (6,14), y esto es logrado directamente utilizando el diluyente a base de glucosa-EDTA.

El proceso de centrifugación ha sido adoptado por la mayoría de las investigaciones realizadas en semen equino y éstas se basan en las siguientes premisas:

1) La centrifugación permite liberar la célula del plasma seminal (6,7,18,34,48,50,). Si bien es poco lo que se conoce en la actualidad sobre la naturaleza del daño espermático causado por la centrifugación (6), está plenamente comprobado que el plasma seminal inhibe la capacitación espermática (57), interfiere con la

motilidad postdescongelación (33) y con la penetración en el óvulo, al igual que reduce el consumo de oxígeno celular en el espermatozoide (29,56,57).

2) La centrifugación ofrece la oportunidad de concentrar las células espermáticas y poderlas rediluir en un medio que les permitan sobrevivir por largos periodos, así como hacer las diluciones en función de las dosis que sean necesitadas (6,17,29,56).

Una consideración muy importante es que las secreciones prostáticas, ampulares y bulbouretrales (primera y segunda fracción del eyaculado) si son necesarias para la vida del espermatozoide (57), y éstas también serán retiradas cuando se centrifugue. Así, que hay que ponderar los efectos detrimentales que se van a presentar con la centrifugación sin olvidar que la concentración del paquete espermático es deseable cuando se va a congelar semen (6,57). Este detrimento se ha calculado entre un 5-10 % de pérdida en la recolección del paquete espermático después del centrifugado (6,33). Sin embargo otros autores afirman que estas pérdidas no influyen negativamente de manera significativa en la sobrevivencia espermática (17), y aún más, incrementa la motilidad postdescongelación cuando se le compara con un eyaculado que ha sido centrifugado sin que se le haya adicionado un diluyente para centrifugación (33).

Como fue dicho en líneas anteriores el semen recién colectado debe ser mezclado con el diluyente, el cual se encuentra a temperatura de 37° C, dentro de los primeros

2 minutos postcoleccion. La dilucion que han recomendado Martin y col. es de 1 : 1, aunque otros han utilizado diluciones de hasta 1 : 5 (24,29,56). Se ha demostrado que la dilucion 1 : 1 es suficiente para recolectar en el paquete postcentrifugacion el 90-95 % de los espermatozoides (6), es por ello que fue elegida esta dilucion como base para este estudio, tanto mas cuando se ha determinado que una excesiva dilucion del semen reduce la viabilidad espermatica aunque sin detrimento celular (57).

Una vez mezclados el semen y el diluyente se les da un periodo de adaptacion que incluye un descenso en la temperatura hasta alcanzar la ambiental, con el fin de facilitar la sedimentacion cuando se centrifugue (6,24). Esta sedimentacion es mas efectiva ($P < 0.01$) cuando al depositar el semen diluido en los tubos de centrifuga sean llenados solo hasta 20 ml por tubo y no con 40 ml (6).

Durante este periodo de adaptacion, que suele ser de 10 minutos aproximadamente, se realiza el conteo espermatico, y para ello se utiliza el hemocitometro de Spencer de manera convencional (13,16,24), teniendo la precaucion de que una vez hecho el calculo final este debe ser multiplicado por 2, ya que la muestra es una solucion diluida 1 : 1

La velocidad de centrifugacion es un aspecto muy importante a considerar, ya que se puede presentar sedimentacion incompleta al utilizar el diluyente de

Martin y col (33) a velocidades menores de 1000 x g en cortos periodos de centrifugación (6), siendo así, existen trabajos con este procedimiento (9,23,32,59). Por otro lado, se puede presentar que el paquete espermático se quede adherido al fondo del tubo, dificultando su retiro sin dañar los espermatozoides. Esto sucedió al utilizar el diluyente de Cochran y col con velocidad de 1000 x g durante 5 min (18,24).

Cuando se utiliza el diluyente de Martin y col. (33), una velocidad de 400 x g durante 15 minutos, es un periodo suficiente para que el paquete espermático se sedimente suavemente, logrando así la recuperación de hasta el 95 % de los espermatozoides (9,24,56). Después de la centrifugación se debe retirar el sobrenadante y dejar el paquete espermático a la espera del diluyente de congelación, el cual será vaciado en los tubos de centrifuga para que se resuspenda (33). La sobrevivencia de las células dependerá en gran medida de la sutileza con que se agregue y mezcle el diluyente de congelación con el paquete espermático.

Para el momento en que el proceso de centrifugación ha concluido, el calculo de la concentración espermática y de la motilidad ya deben estar listos para que se pueda calcular el total de espermatozoides viables para ser congelados y así conocer la cantidad de diluyente de congelación necesario para resuspender el paquete espermático en función de la concentración final que llevará la dosis.

El diluyente de congelación (6,7,9,29,33) tiene los siguientes ingredientes:

diluyente centrifugación	25	ml
lactosa al 11%	50	ml
glicerina	4	ml
yema de huevo	20	ml
pasta de orvus	0.5	ml
agua destilada c.b.p.	100	ml

Antes de proseguir con el proceso de congelación sería recomendable mencionar el uso de cada uno de los ingredientes que componen a estos diluyentes.

La glucosa es el elemento energético por excelencia, proporciona a la célula el ATP necesario para su metabolismo. El citrato de sodio también proporciona energía. La glucosa y el citrato actúan además como agentes osmóticos, al igual que el bicarbonato de sodio, elemento amortiguador del pH en la solución (2).

El EDTA (etilendiaminotetraacetato disódico) es usado por primera vez como parte de un diluyente para semen de equino por Naumenkov y Romankova en 1970 (39). Horsten en 1972 (17) lo utilizó como diluyente de descongelación de pellets de semen de equino. En toda la literatura citada no se reporta la función específica del EDTA en el diluyente, se puede suponer que por su efecto quelante es utilizada como protector de membrana y preservador de la viabilidad de la célula durante el proceso de centrifugación - congelación.

Los antibióticos presentes en el diluyente reducen o eliminan las bacterias que pudieron haber contaminado el

semen durante la colección (1,2,25,44,46,56). Los principales microorganismos patógenos que contaminan el eyaculado son Klebsiella sp. y Pseudomona sp., y para éstos se recomienda la administración de polimixina B (53), así como penicilina - estreptomicina (33).

La pasta de orvus (trietanolamina lauril sulfato de sodio) es un agente emulsificante descrito por Graham y col. (17) en 1971 como protector del acrosoma en espermatozoides porcinos durante la congelación y es utilizado para reforzar la protección fosfolipídica de la yema de huevo en el diluyente (33). La yema de huevo proporciona los componentes nutricios de proteína y lípidos, sobre todo fosfolípidos, y permite al espermatozoide sobrevivir a condiciones adversas como la reducción de la temperatura y los cambios de presión osmótica o de pH (44). En cuanto a su porcentaje de inclusión se ha demostrado que a medida que pasa el tiempo el efecto de la yema de huevo sobre la motilidad progresiva es mejor cuando ésta se encuentra a 16 o 20 % que a 12 % (9).

El glicerol es utilizado como crioprotector para que no penetre el agua a la célula durante el proceso de congelación y evitar así la producción de cristales de hielo intracelular. Su función específica es desplazar el agua intracelular además de amortiguar el pH para que inhiba la concentración de solutos intracelulares (2,15,45,56). Su inclusión dentro del diluyente es por lo general del 4 %, ya que esta concentración es la que ha

resultado estadísticamente significativa en una motilidad postdescongelación mayor que otras concentraciones probadas dentro del rango de 1-6 % (6,9,27).

Una vez resuspendido el paquete espermático a la concentración deseada en el diluyente de congelación, debe dársele un periodo de equilibrio de aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente (9,20,24,29,47,56) el cual será utilizado para el envasado del semen dentro de las pajillas y/o macrotubos. Cada dosis de semen debe contener cierto número de espermatozoides móviles al momento del envasado, por ello la cantidad de diluyente de congelación que se añade debe ser la que permita obtener la dilución adecuada a partir de un eyaculado con cierto volumen, concentración y motilidad inicial. El número de espermatozoides móviles en el eyaculado se calcula multiplicando los valores iniciales de:

$$\begin{array}{l} \text{Volumen} \times \text{concentración} \times \text{motilidad} \\ (\text{ml}) \quad (\text{N}^\circ \text{espera/ml}) \quad (\%) \end{array}$$

Antes de calcular la cantidad de diluyente a utilizar se debe considerar una pérdida del 10 % durante la centrifugación.

Existen básicamente dos métodos de congelación de semen de equino, manual y automatizado, el segundo está regido por un sistema computarizado el cual programa el descenso de la temperatura automáticamente (9,11).

Para el método manual, el cual fue utilizado en este experimento, se recomienda el uso de una caja de poliestireno de 32x25x24 cms dentro de la cual tiene una

rejilla que servirá como base para colocar los envases. Esta base debe tener una marca que indique el nivel de nitrógeno depositado de manera que se logre obtener una distancia uniforme desde el nitrógeno hasta los envases de entre 1-4 cms (6,7,24,33,59,60), dependiendo de la velocidad de pre congelación que se pretenda.

2.4. Descongelación del semen

Para cada envase el método de descongelación es particular.

El macrotubo requiere de su inmersión en agua a temperatura de 50° C durante 40 seg (24,37,56) ó 45 seg (2,3,29,33).

La pajilla es descongelada sumergiéndola en agua a 75° C durante 6-7 seg, no mas, y luego pasarlas a agua con 37° C durante 5 seg como mínimo (2,6,7,9,29,56).

III. MATERIAL Y METODOS

Durante la época de invierno se realizaron colecciones de semen, seguidas inmediatamente por una evaluación preliminar de motilidad inicial y concentración espermática. Los eyaculados que no tuvieron una motilidad progresiva inicial de por lo menos 50 % y un mínimo de espermatozoides de 7,000 millones por eyaculado fueron descartados. Los que sí pasaron estos criterios fueron incluidos en el experimento. Se realizó el número de colecciones necesarias para obtener 8 eyaculados congelables, extraídos de 5 sementales.

El semen fue colectado mediante el uso de una vagina artificial modelo Hannover* a la cual se le adaptó en el receptáculo para el eyaculado 3 gasas como filtro para separar la fracción gel del semen y evitar así la aglutinación de los espermatozoides, además de retirar cualquier cuerpo extraño del semen (25,56). Una vez obtenido el semen libre de gel se verificó su volumen, posteriormente se colocó una gota del semen con solución Hancock modificada (22) en un portaobjeto previamente calentado a 37° C, para la evaluación inicial del acrosoma en el microscopio de contraste de fases. Inmediatamente después el semen se mezcló con el diluyente de centrifugación (29,33), que estaba a 37° C y que tenía como ingredientes:

* Gummi - Bertram, Hannover, West Germany

glucosa	59.985 g
EDTA	3.700 g
citrato sódico dihidro	3.699 g
bicarbonato de sodio	1.200 g
sulfato de polimixina B	10.6 U I
agua destilada c.b.p.	1 litro

El pH de este diluyente es de 6.59 con una concentración de solutos de 409 mOsm/Kg.

Una vez diluido el semen se evaluó la motilidad progresiva y la concentración espermática con un hemocitómetro de Spencer. Posteriormente el semen diluido se centrifugó a 400 x g por 15 minutos, al término de esto se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete espermático con un segundo diluyente para congelación (6,7,9,33) que estaba a temperatura ambiente y que tenía por ingredientes:

diluyente de centrifugación	25 ml
pasta de orvus	0.5 ml
lactosa al 11 %	50 ml
glicerina	4 ml
yema de huevo	20 ml
agua destilada c.b.p.	100 ml

La cantidad de diluyente que se añadió fue la necesaria para realizar una primera resuspensión a una concentración de 800 millones de espermatozoides por mililitro, parte de la cual se envasó en tres macrotubos de 4 ml y tres pajillas de 0.5 ml. posteriormente se procedió a diluir el remanente hasta una concentración de 100 mill/ml, con la que se llenaron otros 3 macrotubos y 3 pajillas. Desde que se resuspendió el semen con el diluyente de centrifugación, hasta que se realizó la

congelación pasó un tiempo de entre 20 y 30 minutos como periodo de equilibrio (9,20,24,47,56). Se utilizó el sistema de congelación manual sometiendo ambos tipos de envase a un proceso de congelamiento en vapores, para lo cual se colocaron en posición horizontal dentro de una caja de poliestireno sobre una base que se encontraba a 1 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido (6,24,33,59,60). Después de 20 minutos se procedió a la introducción de los envases al termo de nitrógeno. Al cabo de 7 días se descongelaron las muestras para su análisis postdescongelación. De cada eyaculado se descongelaron 3 4 macrotubos y 3 pajillas de cada una de las 2 concentraciones espermáticas. Para descongelar se sumergió el macrotubo en agua a una temperatura de 50° C por 40 segundos (24,37,56), mientras que las pajillas se sumergieron en agua a 75° C por 7 seg y después en agua a 37° C por 5 seg como mínimo (6,9).

Se analizó la motilidad progresiva postdescongelado con ayuda de un microscopio óptico con objetivo 100 X, y la integridad acrosomal y morfología con microscopio de contraste de fases. Para esta evaluación fue necesario el conteo de 300 espermatozoides por cada una de las muestras (1,16,22).

Tanto la motilidad progresiva como el daño acrosomal fueron estudiadas estadísticamente mediante un análisis de varianza en un diseño factorial 2 x 2 en la que los factores considerados fueron 2 concentraciones y 2 sistemas de envasado (10).

IV. RESULTADOS

Al estudiar la motilidad en función de la presentación del envase (Cuadro N° 1) se encontró una motilidad significativamente mayor en el semen fresco que en el semen descongelado, independientemente de si había sido envasado en macrotubo o pajilla ($P < 0.01$). No hubo diferencia entre macrotubo y pajilla con respecto a la motilidad postdescongelado. En cuanto al estudio de la motilidad en relación con la concentración (Cuadro N° 2) se encontró mejor porcentaje de motilidad en aquellos espermatozoides envasados a concentraciones de 800 mill/ml que en los envasados a concentraciones de 100 mill/ml, independientemente del tipo de envase ($P < 0.01$).

CUADRO N° 1. Variación de la motilidad en función de la presentación.

PRESENTACION	MOTILIDAD (% \pm e.e.)
FRESCO	80.62 \pm 2.20 (a)
MACROTUBO	35.31 \pm 1.81 (b)
PAJILLA	39.69 \pm 5.33 (b)

Literales de columna diferentes varían estadísticamente ($P < 0.01$)

El cuadro N° 3 describe el porcentaje de espermatozoides normales que se encontraron en el estudio, en relación a la presentación en que se envasaron, y por lo visto hay uniformidad en este hallazgo independientemente de la presentación, al igual

que en el porcentaje de espermatozoides normales en función de la concentración utilizada (Cuadro N° 4).

CUADRO N° 2. Variación de la motilidad postdescongelación en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	MOTILIDAD (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	29.16 ± 1.68 (a)
	800 mill/ml	41.45 ± 2.69 (b)
PAJILLA	100 mill/ml	25.86 ± 1.90 (a)
	800 mill/ml	53.52 ± 9.75 (b)

literales de columna diferentes varían estadísticamente (P < 0.01)

CUADRO N° 3. Variación del porcentaje de espermatozoides normales en función de la presentación del envase.

PRESENTACION	NORMALES (% ± e.e.)
FRESCO	87.00 ± 4.40
MACROTUBO	87.39 ± 2.37
PAJILLA	96.86 ± 2.50

(P) 0.05)

No hubo diferencias entre presentaciones con respecto al daño acrosomal (Cuadro N° 5), no así en función de la concentración (Cuadro N° 6), donde se presentó una diferencia significativa menor en el promedio de daño acrosomal en la concentración de 100 mill/ml que en la concentración de 800 mill/ml (P < 0.01).

CUADRO N° 4. Variación del porcentaje de espermatozoides normales en función de la concentración espermática

PRESENTACION	CONCENTRACION	NORMALES (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	88.55 ± 1.94
	800 mill/ml	86.17 ± 4.34
PAJILLA	100 mill/ml	86.95 ± 3.07
	800 mill/ml	86.78 ± 3.93

(P > 0.05)

CUADRO N° 5. Variación en el porcentaje de daño acrosomal en función de la presentación.

PRESENTACION	DAÑO ACROSOMAL (% ± e.e.)
FRESCO	4.16 ± 0.92
MACROTUBO	3.27 ± 0.27
PAJILLA	3.52 ± 0.31

(P > 0.05)

El estudio de los daños en la parte media del espermatozoide en función de la presentación (Cuadro N° 7) reflejó una diferencia estadística entre el estudio en fresco y los envases (P < 0.01), por el contrario no se apreció ningún cambio cuando se evaluó el daño en parte media en función de la concentración (Cuadro N° 8).

El análisis de colas partidas o rotas precisó que tanto el efecto de la presentación como de la concentración no influyeron para obtener variación en el promedio de este daño (Cuadros 9 y 10).

CUADRO N° 6. Variación del porcentaje del daño acrosomal en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	DAÑO ACROSOMAL (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	2.62 ± 0.25 (a)
	800 mill/ml	3.95 ± 0.46 (b)
PAJILLA	100 mill/ml	3.03 ± 0.34 (a)
	800 mill/ml	4.00 ± 0.51 (b)

Literales de columna diferentes varían estadísticamente (P < 0.01)

CUADRO N° 7. Variación del porcentaje de daños en parte media del espermatozoide en función de la presentación.

PRESENTACION	DAÑO PARTE MEDIA (% ± e.e.)
FRESCO	2.75 ± 0.50 (a)
MACROTUBO	1.26 ± 0.14 (b)
PAJILLA	1.07 ± 0.19 (b)

Literales de columna diferentes varían estadísticamente (P < 0.01)

CUADRO N° 8. Variación del porcentaje de daños en parte media del espermatozoide en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	DAÑO PARTE MEDIA (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	1.22 ± 0.22
	800 mill/ml	1.30 ± 0.19
PAJILLA	100 mill/ml	0.98 ± 0.15
	800 mill/ml	1.15 ± 0.15

(P > 0.05)

CUADRO N° 9. Variación del porcentaje de colas partidas en función de la presentación.

PRESENTACION	COLAS PARTIDAS (% ± e.e.)
FRESCO	1.75 ± 0.37
MACROTUBO	2.65 ± 0.29
PAJILLA	2.68 ± 0.25

(P > 0.05)

CUADRO N° 10. Variación del porcentaje de colas partidas en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	COLAS PARTIDAS (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	2.70 ± 0.27
	800 mill/ml	2.59 ± 0.53
PAJILLA	100 mill/ml	3.06 ± 0.31
	800 mill/ml	2.33 ± 0.37

(P > 0.05)

En cuanto al estudio de las colas dobladas se obtuvo una diferencia estadística ($P < 0.01$) al encontrar mayor promedio de colas dobladas en las pajillas que en los macrotubos y en fresco (Cuadro N° 11). En el cuadro N° 12 se puede ver que la concentración no influye para que se presenten variaciones en el promedio de colas dobladas.

Todos los casos encontrados sin cola y que fueron estudiados en función de la presentación (Cuadro N° 13) mostraron que en los macrotubos existe un mayor promedio de células sin cola que en las pajillas ($P < 0.01$). La concentración espermática no incidió en este tipo de daño

celular (Cuadro N° 14).

CUADRO N° 11. Variación del porcentaje de colas dobladas en función de la presentación.

PRESENTACION	COLAS DOBLADAS (% ± e.e.)
FRESCO	2.29 ± 0.52 (b)
MACROTUBO	2.61 ± 0.20 (b)
PAJILLA	4.09 ± 0.37 (a)

Literales de columna diferentes varían estadísticamente (P < 0.01)

CUADRO N° 12. Variación del porcentaje de colas dobladas en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	COLAS DOBLADAS (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	2.56 ± 0.23
	800 mill/ml	2.66 ± 0.33
PAJILLA	100 mill/ml	4.21 ± 0.52
	800 mill/ml	3.98 ± 0.54

(P > 0.05)

CUADRO N° 13. Variación del porcentaje de espermatozoides sin cola en función de la presentación.

PRESENTACION	SIN COLA (% ± e.e.)
FRESCO	2.04 ± 0.41
MACROTUBO	2.80 ± 0.27 (a)
PAJILLA	1.74 ± 0.19 (b)

Literales de columna diferentes varían estadísticamente (P < 0.01)

CUADRO N° 14. Variación del porcentaje de espermatozoides sin cola en función de la concentración espermática.

PRESENTACION	CONCENTRACION	SIN COLA (% ± e.e.)
MACROTUBO	100 mill/ml	2.31 ± 0.27
	800 mill/ml	3.30 ± 0.47
PAJILLA	100 mill/ml	1.75 ± 0.23
	800 mill/ml	1.73 ± 0.31

(P) 0.05)

V. DISCUSION

En el cuadro N° 1 se presentan los resultados obtenidos de la motilidad después de la descongelación. En esta se puede visualizar el efecto detrimental que ejerce en general la congelación sobre las células espermáticas. En el caso de los macrotubos la reducción de la motilidad fue del 56 % en relación al semen fresco, la cual dista del 41 % de reducción que presentaron Kloppe y col.(24); sin embargo, la motilidad inicial promedio que determinaron ellos fue de 58 % y la motilidad final fue de 34 % , en cambio, en este experimento se determinó la motilidad inicial en 80.62 % y la final en 35.31 % . Como se ve, la motilidad final es semejante a la del presente estudio , lo que varía es el valor inicial de la motilidad el cual define un criterio muy estricto en la evaluación subjetiva de dicha motilidad, mismo que fue apreciado a lo largo del estudio de la literatura (5,52,62), pero que no es compartido por los autores de este trabajo por considerar que se está menospreciando una porción de espermatozoides móviles que serán útiles para obtener una mayor cantidad de dosis por eyaculado.

En las pajillas la situación es parecida, en el sentido de que la reducción fue de 50 % , resultando en una motilidad final de 39 % siendo ésta similar a las encontradas por otros investigadores (6,7,18,24, 48,59,60), las cuales fluctuaron entre 29 % y 55 %.

Ambos resultados están dentro del criterio muy generalizado de que por arriba del 30 % de motilidad postdescongelación es un buen indicador de fertilidad elevada (21,59,60), aunque hay quienes opinan que debe ser de 35 % la mínima cantidad mótil capaz de obtener rangos de fertilidad aceptables (6,56).

Se puede inferir que el efecto de la presentación no influyó para que la motilidad variara (3), aunque como era de esperarse, la congelación produce un deterioro que se manifiesta en una reducción considerable en la motilidad final, comparada con la inicial (6,9,25,27,44,48,50 56,57).

En cuanto al efecto que ejerció la concentración sobre la motilidad postdescongelado se puede decir que fue determinante; Aquellas pajillas y macrotubos que fueron llenados con semen a concentración de 800 mill/ml tuvieron mejor respuesta de motilidad que aquellos envases cuya concentración espermática fue de 100 mill/ml, coincidiendo con el trabajo de Aukema (3), que aunque como se dijo anteriormente utilizó otras concentraciones el resultado fue similar: 40.71 % de motilidad para 250 mill/ml vs. 21.75 % con 50 mill/ml.

En los cuadros 3 y 4 se muestra claramente que el porcentaje de espermatozoides normales no varío ante el manejo de la congelación - descongelación a la que fue sometido. Según la "Society for Theriogenology" (22) el porcentaje de espermatozoides normales es el punto más importante al estudiar la morfología espermática y es

aceptable para semen fresco un promedio de normalidades mínimo de 50 % (52,59,60,62), y específicamente este trabajo con un porcentaje de espermatozoides normales postdescongelación de 87 % es perfectamente compatible con aquellos que encontraron valores comprendidos entre 55 y 83 % de normalidades (17,18,59,62), lo principal deberá ser saber utilizar la conjugación de los factores motilidad, concentración y volumen para calcular la dosis final a envasar. Una dosis efectiva para la inseminación artificial debe tener un mínimo de 200 millones de espermatozoides con motilidad progresiva antes de la inseminación (35,56,59). Es importante aclarar que al porcentaje de espermatozoides normales se pueden añadir aquellos que tienen una gota citoplasmática distal ya que se ha comprobado que además de ser un fenómeno normal la falta de desprendimiento de la gota a ese nivel no altera la función de dicha célula (1).

En este experimento el daño acrosomal estuvo influenciado directamente por la concentración presentando una diferencia significativa de mayor grado de daño para los envases con concentración de 800 mill/ml que en los de 100 mill/ml. Esto es debido posiblemente a una reducción del espacio vital y de la obtención de nutrientes convertibles en ATP intracelular, lo cual concuerda con el trabajo de Aukema (3) en el que se demuestra una concentración mayor de ATP intracelular en el semen diluido a 50×10^6 espermatozoides/ml, que en el semen a 250×10^6 espermatozoides/ml. Otra explicación

para esta situación es que el proceso de congelación - descongelación haya provocado una reacción acrosomal prematura con la consecuente liberación de acrosina y ruptura de las membranas acrosomales interna y externa manifestándose esto, a fin de cuentas como un daño acrosomal en el microscopio. Sin embargo, el porcentaje de daño acrosomal de las presentaciones postdescongeladas que fue de 3.27 para el macrotubo y 3.52 para la pajilla no se diferencian de las reportadas por Von Frey (12) quien encontró anomalías acrosomales del orden de 3.62 y 2.72 cuando trabajó con macrotubos descongelados con el método utilizado por este estudio. No deben pasar desapercibidos dos trabajos publicados por Volkmann y col. (59,60) en los cuales aparecen reportados daños acrosomales en el rango de 46 a 53 % valores que se antojan muy altos tomando en cuenta que aun faltaría por definir los daños en parte media y cola, pero a su favor hay que mencionar el uso de una triple tinción especial para ver acrosoma, Spermac, la cual no fue utilizada en este experimento por considerar que el microscopio de contraste de fases con el uso de la solución de Hanckok modificada (22) tiene la resolución necesaria para tal fin. Volkmann no precisa su método de apreciar el acrosoma exclusivamente por lo tanto de manera especulativa se podría pensar que estos resultados corresponden a un daño total del espermatozoide lo cual si se relaciona con el uso de una tinción tan reveladora como es la Spermac. En el cuadro N° 7 se puede notar

que efectivamente durante el proceso de congelación se presentan cambios estructurales. Hubo una reducción significativa de los daños en parte media del semen fresco al descongelado, independientemente de su presentación, lo cual no parece lógico, a menos que dichos cambios se transformen en otros daños, como pueden ser cabezas sueltas, colas partidas etc. El efecto de la concentración no influyó para encontrar cambios en los daños en parte media.

El incremento de colas partidas o rotas después de la descongelación parece normal encontrarlo debido al incesante manejo a que se somete al semen, sobretudo durante la centrifugación y que como fue dicho antes produce una merma de un 5 - 10 % en la calidad espermática. Esto mismo sucedió con la presentación de colas dobladas, aunque es de hacer notar ese aumento significativo encontrado en las pajillas el cual se manifestó más cuando la concentración fue menor. Al estudiar los espermatozoides sin cola la situación fue al contrario, en los macrotubos se precisó un aumento significativo en el porcentaje de células sin cola con respecto a las pajillas.

Todo lo anterior hace reflexionar acerca de la poca diferencia que se puede definir entre un envase y otro, en este caso del macrotubo de 4 ml y la pajilla de 0.5 ml, para con los daños que se producen en el proceso de congelación - descongelación, sin embargo existen algunas consideraciones que no deben pasar por alto cuando se

analizan los dos métodos:

1) La pajilla entra en un proceso de congelamiento más rápido que el macrotubo y esto tiene un efecto menos deteriorante en la calidad del semen (2,11).

2) Con la pajilla se pueden cometer errores de descongelación por utilizar altas temperaturas con tiempos tan cortos, en ese sentido el macrotubo reduce los riesgos potenciales durante este evento (6,32,33).

3) El porcentaje de daño acrosomal postdescongelación es un parámetro poco relevante en comparación con otros eventos que merman mucho más la cantidad final de espermatozoides viables, por lo tanto no debe ser tomado en cuenta para determinar la utilización de algún envase para crioconservación.

VI. CONCLUSIONES

En virtud de que el congelamiento de semen de equino produce una reducción en la motilidad final se hace necesaria una selección del semental para evaluar la congelabilidad de su semen ya que existe una marcada diferencia entre ellos para tal efecto. Esta selectividad se debe basar en los siguientes parámetros:

Motilidad inicial mínima:	60 %
Espermatozoides anormales máximo:	30 %
Anormalidad acrosomal máxima:	10 %
Concentración espermática mínima:	200 mill/ml

El envase criopreservador no es lo importante a considerar, sino la concentración a la que se pretende envasar el semen; Mientras más concentrada esté la solución la respuesta en motilidad postdescongelación será mejor, y en este sentido la pajilla cumple el objetivo de obtener una concentración espermática alta con muy poco volumen resultando en una mayor cantidad de dosis. Por último es importante considerar el criterio de manejo, el cual se inclina a favor del uso del macrotubo tanto por los riesgos antes mencionados como por la facilidad de almacenamiento y registro.

VII. LITERATURA CITADA

1. Allen, H.E.: Fertility and Obstetrics in the Horse. Blackwell Scientific Publications, London, 1988.
2. Amann, R.P., Pickett, B.H.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J. Eq. Vet. Sc., 7: 145-173 (1987).
3. Aukema, J.J.: Evaluation of deep frozen horse semen. Schoonoord, Netherlands, Report B-274: 78 pp (1985).
4. Barker, C.A., Candier, J.C.: Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. Can. J. Comp. Med., 21: 47-51 (1957).
5. Braun, J., Hulpert, E., Leidl, W.: Quality of stallion ejaculates outside the breeding season, and its effects on deep freeze preservation. Pferderheilkunde, 2, 101-108 (1986).
6. Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P., Pickett, B.H.: Effect of centrifugation, glycerol level, cooling to 5° C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine sperm. Theriogenology, 22: 25-38 (1984).
7. Cochran, J.D., Amann, R.P., Squires, E.L., Pickett, B.H.: Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0 ml straws. Theriogenology, 20: 735-742 (1985).
8. Cristanelli, M.J., Squires, E.L., Amann, R.P., Pickett, B.H.: Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. Theriogenology, 22: 39-45 (1984).
9. Cristanelli, M.J., Amann, R.P., Squires, E.L., Pickett, B.H.: Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and on freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology, 24: 681-686 (1985).
10. Daniel, H.W.: Biostatística, Limusa, Mexico, 1980.
11. Delius, D.: Investigations on the freezing of stallion semen in units of .5 ml by means of a computerized freezing programme. Thesis, Tierärztliche Hochschule, Hannover, G.F.R., : 161 pp (1985).

12. Frey Von, G.H., Bernal, S.A.: Congelación y evaluación de semen de potro. Av. Invest., Santiago, Chile, : 176-180 (1984).
13. Galina, C.S., Saltiel, A., Valencia, J., Becerril, J., Bustamante, G., Calderón, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguín, A., Páramo, R., Zarco, L.: Reproducción de Animales Domésticos, Linusa, México, 1986.
14. González, N., Pedrozo, R., Cabrera, L.: Presión osmótica en un diluyente para semen de equino basado en glucosa, lactosa, rafinosa y leche. Anim. Breed. Abstr., 47: 437 (1979).
15. Guay, P., Rondeau, M., Boucher, S.: Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and of stallion semen before and after thawing. Eq. Vet. J., 13: 177-182 (1981).
16. Hafez, E.S.E.. Estudios del semen. En : Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. E.S.E. Hafez. 5ta edición. Interamericana-McGraw Hill, México, 1989.
17. Hellemann, C.: Conservación de semen de equino por congelación. Arch. Med. Vet., 17: 75-82 Valdivia, Chile (1985).
18. Hellemann, C.; Borgeat, N.: Congelación de semen de equino en pajuelas. Proc. 9na Reun. A.L.P.A., Chile, 1983, RF-45.
19. Iljinskaja, T.: The effects of various factors on stallion spermatozoa frozen to -70 C. Cornell Vet., 60: 463-475 (1956).
20. Jiménez, C.F.: Effects of Equex STM and equilibration time on the prefreeze and post thaw motility of equine epididymal spermatozoa. Theriogenology, 28: 773-782 (1987).
21. Julienne, P.: Artificial insemination with fresh semen from French Trotter stallions and with frozen semen from French Saddle stallions at a stud farm. Cent. Etud. Rech. Econ. Organ. Prod. Anim.: 44-56 (1987).
22. Kenney, R.M., Hurtgen, J., Pierson, R., Witherspoon, D., Simons, J.: Clinical fertility evaluation of the stallion. Soc. Theriogenology, 9, Nebraska U.S.A. (1983).
23. Klem, M.E., Kreider, J.L., Pruitt, J.B., Potter, G.D.: Motility and fertility of equine spermatozoa extended in bovine serum albumin and sucrose. Theriogenology, 26, 569-576 (1986).

24. Kloppe, L.H., Varner, D.D., Elmore, R.G., Bretzlaff, K.N.; Shull, J.W.: Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. Theriogenology, 29: 429-438 (1988).
25. Knoop, C.E.: Freezing equine semen for use in artificial insemination. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, vol 2: 1577-1580 (1968).
26. Kreider, J.L., Tindall, W.C., Potter, G.D.: Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. Theriogenology, 23: 399-408 (1985).
27. Lemos de Oliveira, M.A.: Effects of different processing procedures on motility and acrosin activity in the thermo resistance test and on the fertility of deep frozen horse semen. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1982, 167 pp.
28. Los Reyes, M.I. de: Estudio comparativo de semen de potro obtenido en extracciones sucesivas y sometido a congelación. Av. Prod. Anim., Chile, 9, 207-208 (1984).
29. Loomis, P.R.: Techniques and applications of artificial insemination with frozen equine semen. Eg. Vet. Sci., 6, 139-142 (1986).
30. Love, C.C., Loch, H.L., Bristol, F., Garcia, M.C., Kenney, R.M.: Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. Theriogenology, 31: 613-622 (1989).
31. Mac Dougall, F.H.: Thermodynamics and Chemistry. 3rd ed. John Wiley and sons Inc, New York, 1948.
32. Magistrini, M., Chanteloube, P., Palmer, E.: Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J. Reprod. Fert., Suppl. 35: 127-133 (1987).
33. Martin, J.C., Klug, E., Gunzel, A.R.: Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J. Reprod. Fert., Suppl. 2, 27: 47-51 (1979).
34. Merkt, H.: Artificial insemination and horse breeding. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, vol 2: 1581-1583 (1968).
35. Muller, Z.: Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. J. Reprod. Fert. Supplement, 35: 121-125 (1987).

36. Muller, Z. Rob, O.: The results of inseminating mares with deep frozen semen after a spontaneous or induced oestrus using Alestrum inj. spofa. Biol. Chem. Zivocisna Vyroby-Vet., 22: 259-264 (1986).
37. Murav'eva, L., Naumenkov, A.: Thawing semen. Konevodstvo i Konnyi Sport, 5: 32 (1983).
38. Nagase, H., Tomisuka, T., Oshida, H., Mikawa, T., Sagara, Y., Hoshi, S., Niwa, T.: Studies on the freezing stallion semen. Factors affecting survival ratios of stallion spermatozoa after freezing and thawing results of fertility trial. J. Anim. Reprod., 12: 52-57 (1966b).
39. Naumenkov, A., Romankova, N.K.: Adiluent for stallion semen. Anim. Breed. Abstr., 39: 2823 (1971).
40. Nishikawa, Y., Waide, Y., Shinomiya, S.: Studies on deep freezing of horse spermatozoa. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, vol 2: 1601-1604 (1968).
41. Oshida, H., Mikawa, S., Horiuchi, H., Takahashi, H., Tomisuka, T., Nagase, H.: Studies on the freezing of the stallion semen. Pellet frozen semen preserved in liquid nitrogen. Anim. Breed. Abstr., 36: 2280 (1968).
42. Pace, M.H., Sullivan, J.J.: Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rates in mares inseminated with frozen stallion semen. J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 115-121 (1975).
43. Palmer, E., Domerg, D., Fauquenot, A., De Sainte-Marie, T.: Artificial Insemination of mares: Results of five years of research and practical experience. Inst. Nat. Rech. Agron.: 137-147 (1984).
44. Pickett, B.H., Amann, R.P.: Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. J. Eq. Vet. Sci., 7: 289-302 (1987).
45. Platov, E.M., Rombe, S.M.: Freezing semen diluted in lactose-yolk with 2 percent glycerol. Preliminary communication. Anim. Breed. Abstr., 39: 1437 (1971).
46. Polge, G., Rowson, L.E.A.: Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79 C. Referido en Arch. Med. Vet., vol XVII número 2, 1985, Santiago de Chile.
47. Province, C.A., Squires, E.L., Pickett, B.H., Amann, R.P.: Cooling rate, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. Theriogenology, 23: 925-934 (1985).

48. Rajamannan, A., Zemjanis, R., Ellery, J.: Freezing and fertility studies with stallion semen. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, vol 2: 1601-1604 (1968).
49. Rombe, S.M., Kotjagina, V., Puler, N., : An improved method of preserving semen at -79 C. Anim. Breed. Abstr., 33: 2014 (1965).
50. Rombe, S.M., Kotjagina, V.: Long term preservation of stallion semen. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, vol 2: 1581-1583 (1968).
51. Salazar-Valencia, F.: Embryo recovery rates in mares of the Pasofino colombiano breed and deep freezing stallion semen in the tropics. Theriogenology, 19: 146 (1983).
52. Sevinc, A., Yurdaidin, N., Tekin, N.: Freezing semen from Arab and Halfing stallions at the Karacebey State farm and fertility achieved in halving mares. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg., 31: 304-315 (1984).
53. Squires, E.L., McGlothlin, D.E., Bowen, R.A., Berndtson, H.E., Pickett, B.W.: Use of antibiotics in stallion semen for the control of Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa. J. Eq. Vet. Sci., 1: 43-48 (1981).
54. Tischner, M.: Results of artificial insemination of horse in Poland in the post-war. J. Reprod. Fert., Suppl 1, 23: 111-114 (1975).
55. Tolman, R.C.: The principles of statics mechanics, Oxford IUniversity Press, London, 1950
56. Varner, D.D., Dickson, D.: Collection and preservation of stallion spermatozoa. Proc. Anim. Meet. Soc. Theriogenology, new York, U.S.A., : 13-33 (sept 17-19, 1986).
57. Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love C.L., Garcia M.C., Kenney, R.M.: Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. Theriogenology, 28: 709-721 (1987).
58. Villarreal, S.: Manual de manejo reproductivo de la yegua. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1984.
59. Volkman, D.H.: Acrosomal damage and progressive motility of stallion semen frozen by two methods in .5 milliliter straws. Theriogenology, 27: 689-698 (1987).

60. Volkman, D.H., Van Zyl, D.: Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws. J. Reprod. Fert. Suppl. 35: 143-148 (1987).

61. Yi, L.H., Li, Y.J., Hao, B.Z.: A study of the conception rate of frozen horse semen. Chin. J. Anim. Sci. 3: 2-4 (1983).

62. Yurdaydin, N., Sevinc, A., Hladar, H.: Studies on freezing semen of stallions of different breeds. Ankara Univ. Vet. Fak. Derg. 32: 446-455 (1985).

63. Zemansky, M.H.: Heat and thermodynamics, 5th ed. McGraw-Hill Kogakusha, Tokio, 1968.

64. Zmurin, L.M.: Diluents for stallion semen frozen to 20° C. Anim. Breed. Abstr. 30: 804 (1962).