

128
2ej

METODO DE RECOLECCION Y EVALUACION
DEL SEMEN EQUINO

TESIS CON
MILLA DE ORIGEN

MARIA IRENE MACIAS NITO
ASESOR: M.V.Z. RAMIRO CALDERON VILLA.
1991



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

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Desarrollo	7
Discusión	33
Literatura citada	34

RESUMEN

MACIAS NITO MARIA IRENE. Método de recolección y evaluación del semen equino: I Seminario de Titulación. Area animales de servicio y compañía (bajo la supervisión de M.V.Z. Ramiro Calderón V.)

El objetivo del presente trabajo es considerar la importancia de evaluar el potencial de fertilidad del semental antes de integrarlo a cualquier programa reproductivo, utilizando para ello técnicas adecuadas de recolección. El uso de la vagina artificial es el mejor método para la recolección de semen, debido a que favorece la calidad del eyaculado, la cantidad de semen, el rendimiento del semental y reduce la contaminación de la muestra. Los parámetros a evaluar en el semen equino son: volumen total del eyaculado, color, porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides, concentración espermática, espermatozoides totales, morfología, pH seminal, células blancas, células rojas sanguíneas y longevidad del espermatozoide.

INTRODUCCION

La tecnología en la crianza de ganado caballar ha evolucionado lentamente en nuestro país debido a que los fines para los que es producida esta especie son deportivos (polo, charrería, salto, paseo, etc) de trabajo (policía montada, agrícola y forestal) y no para consumo humano, aunado a que su crianza es en extremo costosa (7,12,17).

Sin embargo en los últimos años la investigación en esta área ha evolucionado notablemente y se han desarrollado técnicas para poder evaluar el potencial reproductivo, tanto de la yegua como del semental (7).

Los objetivos de la recolección y evaluación de semen son:

- 1) Determinar el potencial de fertilidad del semental.
- 2) Maximizar el eyaculado, fraccionándolo para inseminar un número determinado de yeguas mediante inseminación artificial (I.A.). ya sea con semen fresco o congelado.
- 3) Preservación del semen de animales genéticamente valiosos (7,12,17).

Uno de los problemas a los que se enfrenta más frecuentemente el criador son los bajos índices de concepción al final de la temporada reproductiva y esto se debe en gran parte a que desconoce la necesidad de evaluar el potencial de fertilidad del semental antes de iniciar la temporada reproductiva (7,24,29).

El objetivo de este trabajo es considerar la importancia de evaluar el potencial de fertilidad del semental antes de introducirlo a cualquier programa de reproducción, utilizando para ello técnicas adecuadas de recolección que sean seguras tanto para el caballo como para la yegua y el personal.

Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino:

Los órganos sexuales primarios son los testículos, los cuales tienen función exocrina: producción de espermatozoides ; y función endocrina: producción de hormonas esteroides. Están protegidos por el escroto (7,11,16,24).

Los órganos sexuales secundarios son los ductos excretores: epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), conductos deferentes , ampolla y uretra.

Las glándulas sexuales accesorias son: ampulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales.

El pene es un órgano que tiene doble función: la expulsión de la orina y depósito de semen en el aparato genital de la hembra.

El prepucio es una estructura desarrollada a partir de la piel en la cual se aloja el pene cuando esta inactivo.

El cordón espermático o plexo pampiniforme esta constituido por arteria, vena espermática y músculo cremáster (2,11,12,16,22).

Control endocrino del aparato reproductor masculino:

Al igual que en la hembra, el hipotálamo recibe un estímulo externo y responde produciendo hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH actúa localmente en la porción anterior de la glándula pituitaria (hipófisis anterior) produciendo la liberación de:

1.- Hormona luteinizante: en el semental esta hormona también se conoce como hormona estimuladora de células intersticiales (ICSH), viaja por sangre hasta los testículos donde estimula a las células del intersticio (células de Leydig) las cuales producen y/o liberan andrógenos o estrógenos.

2.- Hormona folículo estimulante (FSH) manda la señal para que funcionen las células de Sertolli en el testículo. La función mas importante de estas células, es proveer un medio adecuado para el desarrollo de los espermatozoides. También producen una hormona: la inhibina que evita o previene la sobreproducción de FSH.

Las hormonas masculinas o andrógenos (Testosterona, dihidrotestosterona y androstenidona) estimulan las características sexuales secundarias (libido, crecimiento de ciertas masa musculares, establecimiento de jerarquías, etc) (2,7,24).

En el semental los testículos descienden al escroto aproximadamente a las 2 o 3 semanas de edad. En algunos casos sucede desde el nacimiento y empiezan a crecer aproximadamente al primer año de vida, durante su segundo año el proceso de maduración se lleva a cabo y la producción de espermatozoides fértiles aparece mas o menos a los 2-3 años de edad (2,11,16).

Se considera que el animal ha alcanzado la pubertad en el momento en el cual su eyaculado contiene un mínimo de 100×10^6 espermatozoides con un mínimo de 10% de motilidad progresiva. La edad en que se alcanza la pubertad está influenciada por distintos factores: época del año de su nacimiento, estado nutricional, raza, etc (2,6,30).

Fisiología de la producción de los espermatozoides.

El testículo esta formado por una red de pequeños tubos (túbulos seminíferos) en los que se producen los espermatocitos, los túbulos son sostenidos por las células de Leydig (células intersticiales) y drenan en el epidídimo donde se maduran los espermatocitos a espermatozoides. El paso de los espermatozoides a través del epidídimo dura aproximadamente 10 días (2,22).

Espermatogénesis:

Es el proceso mediante el cual se forman los espermatozoides (por mitosis y meiosis) (2,11,12,16). La maduración de una espermatogonia a espermatozoide dura aproximadamente 50 días (2,22).

Eyaculado:

Es el total de materia emitida por el pene del semental durante el coito. Los elementos que lo conforman son:

-Espermatozoides: el 80% están contenidos en las primeras tres expulsiones del eyaculado.

-Plasma seminal: producto de las glándulas seminales, forma el medio en el que se suspenden los espermatozoides.

-Porción gelosa: material geloso, producido por las vesículas seminales. Su función es aglutinar a los espermatozoides. Es emitida en la última parte del eyaculado (1,2,9,11,12,16,22)

DESARROLLO.

Recolección de semen:

El uso de la vagina artificial (V.A.) es esencial para la recolección del semen, debido a que en el caballo no se pueden realizar los procedimientos de electroeyacuación o masaje de ampollas deferentes (12). La experiencia ha demostrado que la correcta preparación y elaboración de la V.A. refleja un mejor rendimiento del semental, mejor calidad del eyaculado, mayor cantidad de semen y menor contaminación de la muestra (2,4,14).

Las características que debe reunir una buena V.A. son:

- 1.- Propiciar un estímulo sexual favorable en el semental (22).
- 2.- Deberá mantener su temperatura por lo menos durante 20 minutos.
- 3.- Ajustable a varias tallas de sementales.
- 4.- Debe ser de fácil ensamble y lo más aséptico posible.

1.- La falta de experiencia de quien maneje la vagina artificial en muchos casos conduce a que el semental desarrolle malos hábitos, como pudieran ser:

- que el caballo realice varias montas antes de eyacular,
- renuencia al estímulo con la V.A.
- libido disminuido.
- conduca que pueda poner en peligro al personal, a la yegua y/o al mismo caballo (22,25).

Una recolección inadecuada o el mal uso de la V.A. puede, eventualmente, frustrar hasta al semental más dócil; si está muy afectado, podrá tener un comportamiento agresivo con la yegua y el operador, pudiendo incluso llegar a morder o patear (2,22).

2.- Deberá mantener su temperatura por lo menos durante 20 minutos, independientemente de la temperatura del medio ambiente (7,8,13,22). Esta condición puede afectar:

-la fertilidad del semen: debido a que temperaturas inferiores a 40°C y superiores a 49°C pueden producir daño irreversible al espermatozoide (13,24).

-conducta sexual del semental, debido a que muchos sementales muestran preferencia por una temperatura en particular, si ésta no es ajustada al gusto del garañón, puede manifestar actitudes anormales como montas continuas, erección sin eyaculación o eyacular antes de que el pene sea introducido en la vagina artificial (4,7,8,13,22).

3.- Ser ajustable a varias tallas de sementales para proporcionar placer. Si la presión del lumen de la V.A. es demasiada, puede producir dolor o incomodidad y la respuesta del semental será separarse de la hembra, embestir, relinchar, intentar separarse de la vagina,

desmontarse y perder el interés (4,7,8,24). La mayoría de las V.A. son mas grandes de lo necesario, los sementales trabajan bien en vaginas de solo 20 pulgadas de largo. El diámetro deberá ser una pulgada mayor que el diámetro del pene en erección (aproximadamente 5 pulgadas) (7,24).

- 4.- Deberá armarse tratando de no contaminar el interior, de manera que el semen se mantenga en condiciones viables (13,22). Se debe tener cuidado para evitar cambios bruscos de temperatura para no dañar al espermatozoide. Es esencial la limpieza del equipo o de los objetos que están en contacto con el semen para maximizar la eficiencia reproductiva. El equipo desinfectado incorrectamente es una causa común de baja motilidad del esperma lo que produce bajos índices de fertilidad (1,4,7,13). El número de espermatozoides perdido por unidad de volumen (ml) de gel es variable (15,23,26). Por tal razón, se recomienda utilizar filtros que reducen la mezcla de gel con la fracción rica en espermatozoides (9,22,28).

**PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCION DEL SEMEN DEL GARASON
UTILIZANDO LA VAGINA ARTIFICIAL MODELO COLORADO.**

Los elementos que constituyen la V.A. modelo Colorado son:

- 1) Un armazón de plástico rígido. El extremo anterior (la parte por la cual entra el pene del semental) tiene un collar plástico para prevenir cualquier lesión o daño al garañon.
- 2) Dos tipos de fundas de látex suave,
 - a) una con el mismo ancho en toda su longitud y,
 - b) otra recta, pero con uno de sus extremos cónico.
- 3) Recipiente de recolección.
- 4) Filtro.
- 5) Abrazadera para sostener el recipiente de recolección en la funda cónica.
- 6) Dos ligas anchas.
- 7) Capuchón para proteger el recipiente recolector (1,2,22).

Para ensamblar la vagina artificial, la funda interna recta se pone dentro del armazón de plástico rígido, dejando salir por ambos lados la misma porción de funda. La funda recta se remanga sobre el collar de plástico en su extremo anterior poniéndole una liga para sostener la funda y prevenir fugas de agua, el otro extremo se extiende hasta donde se desee para doblarse de igual manera colocándole también una liga (1,4,22).

Para seleccionar el tipo de funda que estará en contacto con el pene, se debe tomar en cuenta la preferencia del semental y los costos (22). La funda de látex cónica se coloca pasándola a través del lumen interno de la V.A. doblándose en su parte anterior, colocándole una liga para evitar su deslizamiento durante la colección. La funda debe colocarse sin torceduras o arrugas (1,4,22).

La colocación de las fundas de la V.A., requiere hacerse con cuidado, ya que si se colocan con jalones bruscos o con demasiada fuerza, se deforman y/o rompen y no podran volver a ser utilizados (1,4,22).

Una vez que se ha colocado correctamente la funda de látex, la vagina estará lista para llenarse con agua a 60°C, de manera que al paso de 15 a 20 min. la temperatura interna de la vagina sea de 50°C (1,2,4,7,9,10,24).

Después del llenado de la vagina artificial con agua, se coloca un termómetro de carátula en el lumen de esta, para monitorear su temperatura. El registro de la temperatura deberá tomarse durante diez a veinte minutos, hasta que la

temperatura de la unidad se establezca. Si la V.A. se utiliza antes de que la temperatura se haya elevado al máximo, esta puede estar tan caliente que dañara al semental o al eyaculado. Una vez que la temperatura interna de la vagina se ha estabilizado entre 45-50°C (1,2,7,9,22), 40-42°C (4) estará lista para ser utilizada.

Generalmente en la última etapa de la temporada de reproducción, cuando el semental se vuelve lento para montar o renuente a eyacular, la temperatura interna se puede aumentar hasta 52-54°C sin dañar al esperma, teniendo en cuenta que se requiere mas precaución durante la recolección. No obstante algunos recolectores sean muy precisos determinando la temperatura interna de la vagina artificial con la mano, se debe utilizar siempre un termómetro, y además las lecturas de los termómetro de carátula, se deben comparar contra uno de Mercurio, con agua hirviendo o congelada, por lo menos una vez al mes (22).

Una vez que la yegua esta preparada y la vagina artificial alcanza la temperatura apropiada, se saca un recipiente recolector de la estufa, en donde la temperatura es de 37-38°C, y se le ajusta adentro un filtro de nylon. El borde del aro de plástico del recipiente recolector, al cual se amarra el filtro de nylon, evita que el ensamble del filtro falle dentro del recipiente recolector. La boca del recipiente recolector, con su filtro, se fija con una abrazadera a la parte terminal del forro cónico. El capuchón es retirado del calentador y se pone en el recipiente

recolector de manera que lo proteja y se fija a la vagina artificial (1,24).

El siguiente paso, es lubricar la vagina artificial con jalea lubricante estéril, no espermicida (1,9,24), utilizando un guante de palpación, esto se hace a lo largo de dos tercios del interior de la vagina artificial. Una vez aplicado el lubricante, se saca la mano dejando el guante en el interior, con el extremo salido para doblarlo en el extremo del collar de plástico de la vagina artificial, evitando así la contaminación y pérdida del calor. Si en este proceso se detecta una arruga en el forro debe intentar corregirse el problema, sin comenzar de nuevo. El lubricante puede usarse para ajustar la temperatura interna de la vagina artificial, mas o menos a 1-2°C, así como para ajustar la presión (22).

Preparación del semental para la recolección.

Se requiere de mucha destreza al manejar un semental, para que este obtenga un estímulo sexual favorable. Hay ciertas reglas básicas para hacerlo, pero cada manejador es diferente y también cada semental y lo que pueda resultar bien en un caso, en otro quizá no. Algunos sementales responden solo a una voz de mando mientras que otros requieren de castigos físicos o incluso barreras físicas. Lo ideal es que en todas las granjas se tengan facilidades que permitan al semental acercarse a la yegua con seguridad de

manera que se estimule sexualmente, mientras, se lava el pene, proceso que debe ser también estimulante (22)

Lavado del pene.

El semental se presenta ante la yegua con la mayor libertad posible, sin que peligre el mismo, la yegua o el personal. Cuando se obtiene una erección apropiada el manejador aplica un ligero castigo al semental para que le permita un lavado rápido y efectivo (2,10,22). Generalmente este es un proceso fácil en la mayoría de los sementales. El pene erecto del semental deberá ser desviado y tomado sin hacer presión. Durante este proceso se realiza un examen físico del pene observando cuidadosamente para determinar si no existen lesiones, inflamación del orificio uretral, etc (2,22).

Cuando el semental no ha sido lavado en mucho tiempo se le acumula demasiado esmegma en el pene y en el prepucio, adhiriéndose a los pliegues de piel del prepucio, si no se tiene cuidado al eliminarlo, se puede dañar el pene. En estos casos se recomienda presentar al semental con la yegua y mantenerlo ahí hasta que se consiga una erección adecuada, durante la cual se pueda masajear el pene suavemente con generosas cantidades de lubricante disuelto en agua. Se regresa al semental a su caballeriza por dos horas, por lo menos, para permitir que el lubricante penetre y suavice el esmegma, de tal manera que se le pueda quitar fácilmente al lavar el pene. El jabón que se utiliza para el lavado debe

ser de los menos residuales como el jabón neutro o de coco y se debe enjuagar abundantemente con agua tibia (22).

RECOLECCION DEL SEMEN:

Para la recolección del semen se puede utilizar:

- a) Yegua en calor
- b) Maniquí o yegua fantasma.

a) Yegua en calor:

Cuando se termina el lavado del pene, todo debe estar listo para que el semental se pueda presentar de inmediato con la yegua. El restringir al semental en este momento y sobre todo si se hace frecuentemente puede frustrarlo y dificultar su manejo. La yegua deberá estar bien parada y se tomaran extremas precauciones para asegurar condiciones ideales. Las fallas en esta parte del proceso son las causas mas comunes de accidentes. El recolector debe estar del lado izquierdo del semental, muy cerca y ligeramente atrás del manejador del macho, donde pueda observar a la yegua y al semental y debe dirigir a los manejadores igual que como se hace en un servicio natural (1,2,4,10,22).

Cuando el semental relaja las manos entonces el recolector desvia el pene del semental y lo coloca dentro de la V.A, la cual se está sosteniendo en un ángulo confortable para el semental y adecuado a su empuje. La responsabilidad de conseguir una máxima estimulación sexual en este momento está en manos del recolector (2,22). El peso de la V.A. es

soportado parcialmente contra la yegua. El levantar la V.A. hacia el vientre del semental es mas estimulante que si se empuja hacia abajo del pene. Si el recolector pone la mano al fondo del pene en su parte ventral cuando el semental empieza a eyacular, puede sentir las pulsaciones del semen a través de la uretra, estas se asocian a movimientos de la cola llamados banderilleo (2,4,22), después de varias pulsaciones se deberá bajar gradualmente el extremo de la V.A. En este momento el recolector deberá sostener el pene del caballo y continuar bajando la V.A. hasta dejarla casi vertical, según vaya perdiendo la erección el semental. Mediante este procedimiento se obtiene una separación eficiente de la fracción rica en espermatozoides y la porción gelosa, drenando el semen dentro del recipiente recolector (22,23).

Un error común es: bajar la V.A. durante la eyaculación o disminuir la presión inmediatamente después de la eyaculación, lo que puede producir una exposición de los espermatozoides a temperaturas muy elevadas, aumentando la posibilidad de daño al espermatozoide (13,24).

Una vez que se estabiliza el eyaculado en la V.A. se quita la tapadera del armazón y se permite la salida del agua para reducir la presión interna, lo que favorece la bajada de semen al recipiente recolector (22,23), si esta operación no es suficientemente rápida los espermatozoides quedan nuevamente expuestos al excesivo calor y a la desecación (1,18).

Uso de maniquí:

Toros, carneros y sementales pueden ser entrenados para montar un objeto inanimado y eyacular (7,25). La consistencia y la frecuencia en el desempeño del semental en la recolección de semen ha aumentado con el uso del maniquí (Yegua fantasma) (7.9.14).

Existen varias ventajas de tener entrenado al semental para montar un maniquí:

- a) Terapéutica.- Sementales que están físicamente incapacitados para la monta de una yegua pueden ser aptos de montar un maniquí, sobre todo si éste está adecuadamente construido o es ajustable a la talla y peso de cada semental que lo utiliza (7,14,24).
- b) Conveniencia.- Una vez que el semental ha sido entrenado adecuadamente, es innecesaria una yegua en calor para atraer su atención. Ellos pueden trabajar con el fantasma como si fuera una yegua: cortejando, logrando la erección para el lavado, montando y eyaculando en la VA (10,14,24). El maniquí es particularmente conveniente cuando se tienen sementales para evaluar su potencial de fertilidad, pero no hay una yegua en celo (10,24).
- c) Seguro.- Hay menos posibilidad de lesionar al semental o al operador.

d) Reentrenamiento.- Sementales muy agresivos se pueden entrenar para respetar al maniquí. Además sementales que son muy agresivos con la hembra se reentrenan para disminuir su agresión con la yegua. Los sementales que son impotentes o muestran una conducta sexual anormal debido a lesiones producidas por la yegua, son más fácilmente reentrenados con un maniquí que con una yegua en estro (7,10,14,24).

El resto del procedimiento de recolección de semen es igual que cuando se utiliza una yegua en celo desde la posición del manejador, el colector y el manejo de la V.A.

EVALUACION DEL SEMEN.

Numerosos factores afectan la capacidad reproductiva del semental como pueden ser:

- Inherentes a la capacidad individual de fertilidad.
- Nutrición.
- Edad.
- Salud o condición física del animal.
- Temporada reproductiva o estación del año.
- Conducta sexual.
- Propios de la raza (1,9,10,20,21,22,26).

Se debe reconocer que la fertilidad es un término relativo que puede alterarse fácilmente con el manejo.

Antes de evaluar la muestra de semen, es importante que se haya realizado un examen físico del semental, donde se

incluya: a) la observación del semental durante la monta: reacción ante la yegua, presentación de la erección en un tiempo razonable, realizar la monta y penetración adecuadamente, eyaculación y retirarse hasta que termine de eyacular y no antes; b) examen externo de los genitales: se evalúan los testículos (tamaño, posición, consistencia, temperatura, etc.) (1,21).

La evaluación del semen del caballo debe realizarse :

- a) Antes de su compra-venta.
- b) Anterior a la temporada reproductiva.
- c) Cuando se sospecha que el semental posee baja fertilidad.
- d) Cuando se observa un comportamiento sexual anormal (2,7,22,25,28).

Una evaluación intensiva del semen del garañón ayuda a diagnosticar la fertilidad dando a conocer que tan bien están funcionando los testículos, el epidídimo y las glándulas accesorias sexuales. Es importante hacer notar que una sola muestra de semen no es suficiente para determinar la fertilidad del semental (5,21,26).

Existen básicamente dos procedimientos para realizar la evaluación del semen:

- 1) Se recolecta un mínimo de dos eyaculados a intervalo de una hora y se evalúa el volumen. Deben tener mas o menos el mismo, si la segunda muestra es mas pequeña que la primera, el epidídimo y las glándulas accesorias (que secretan casi todo el fluido seminal) pueden no estar funcionando bien. El

volumen reducido puede ser el resultado de una eyaculación incompleta (1,5,21,29).

2) Se recolectan dos eyaculados con una hora de diferencia, y posteriormente se recolecta un eyaculado por día durante 6 a 7 días, este procedimiento proporciona una información más segura de la cantidad de espermatozoides que eyacula un semental por día, y por lo tanto, del número de hembras que podría cubrir en una temporada reproductiva (5,29).

Parámetros que se deben tomar en cuenta para la evaluación del semen (2,5,7,15,24):

- 1) Porción gelosa y volumen total del semen.
- 2) Color.
- 3) Porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides.
- 4) Concentración espermática (millones de espermatozoides por mililitro).
- 5) Espermatozoides totales (billones de espermatozoides por eyaculado).
- 6) Morfología.
- 7) pH del semen.
- 8) Células blancas.
- 9) Células rojas.

MANEJO DEL SEMEN DESPUES DE LA RECOLECCION.

Los espermatozoides son muy sensibles a los cambios en su medio ambiente: la luz solar, agua, jabón, soluciones antisépticas, germicidas (excepto antibióticos), cambios bruscos de temperatura, etc. pueden alterar su calidad, por ello debe tenerse mucho cuidado cuando se manejan las muestras (23,24).

Una vez recolectado el semen se lleva directamente al laboratorio. Después de usar la vagina, esta debe colocarse en un lugar seguro donde no se ruéde. Se aflojan los amares del capuchón y se quita. La vagina se inclina y se estira la funda cónica para asegurar que todo el semen drene hacia el recipiente recolector (13,14). Ocasionalmente el filtro puede invertirse debido al vacío creado por el seminal al eyacular. Se afloja la abrazadera y se retira el recipiente recolector, quitando también el filtro. El recipiente recolector debe tratarse delicadamente, ya que si se saca muy rápido la porción gelosa del filtro invertido puede impedir el dren del semen al bote.

Evaluación del semen.

1) Porción gelosa y volumen total del semen.

El semen se vacía lentamente del recipiente recolector a una probeta graduada, previamente calentada a 38°C y se mide la cantidad de semen eyaculado. Es importante recordar que a mayor estimulación sexual, mayor será el volumen del eyaculo, sin que esto signifique mayor número de espermatozoides por ml (1,9,21,26). La muestra se deberá identificar y registrar el volumen de semen para tomarlo como referencia en el futuro (15,22).

2) Color.

Después de observar el volumen, se debe evaluar el color y la densidad. El semen debe tener apariencia de leche descremada, casi fluorescente, normalmente tiene un tinte grisáceo o azulado, con textura de aceite mineral. A diferencia de otras especies domésticas, la apreciación visual no basta para determinar la concentración de espermatozoides (2,5).

3) Porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides.

Este procedimiento debe hacerse lo mas rápido y preciso posible las razones de esto son:

- a) Los fluidos seminales son, con frecuencia, detrimentales para los espermatozoides. De hecho, el caso de algunos sementales es una evidencia clínica considerable de que estos fluidos pueden incluso ser tóxicos para su esperma.

D) Aun bajo las mejores condiciones el esperma se deteriora rápidamente. Por lo tanto se requiere que este sea manejado lo mas rápido posible.

La precisión para estimar la motilidad depende de la experiencia del observador, el tipo de equipo que se utiliza y la preparación de la muestra (5,24,28).

Para obtener la motilidad estimada precisa, es esencial diluir el semen en un fluido apropiado conocido como diluyente (extender). Ya que los espermatozoides en semen fresco tienden a agruparse o aglutinarse haciendo imposible una estimación de la motilidad (24).

Usando una pipeta de 0.5 ml tibia, se colocan 0.25 ml de semen entero en 4.75 ml de diluyente de leche descremada, esta división de 1:20 es suficiente para dispersar las células permitiendo la observación individual de los espermatozoides.

Una vez que el semen se añadió al diluyente, se invierte el frasco varias veces para asegurar la mezcla y se coloca en una platina caliente o incubadora. Todo el equipo que esta en contacto con el semen deberá estar limpio y a temperatura corporal (37-38°C).

Para estimar la motilidad es necesario contar con un microscopio de contraste de fases el cual permite resoluciones claras de material de densidad óptica similar. La muestra se deberá observar con un aumento de 200 magnitudes y la estimación de la motilidad de los espermatozoides se hará de la siguiente manera:

Si de 3 espermatozoides observados, 3 tienen movimiento progresivo, tendrá una motilidad del 100 %. El procedimiento se realiza varias veces hasta tener el grado de precisión que se requiere. Es importante hacer notar que en las orillas, las capas delgadas del semen se secan rápidamente, por lo tanto, se deberán observar de 3 a 5 campos cerca del centro de cada muestra.

La estimación de cada campo se promedia, si la diferencia entre dos estimadas es mayor al 10%, se debe preparar otra muestra y volver a evaluarla.

Muchos espermatozoides que se están moviendo pueden no tener motilidad progresiva. Para decir que un espermatozoide tiene motilidad progresiva este debe cruzar el campo microscópico razonablemente rápido y con cada movimiento de cola, la cabeza gira 360°. El espermatozoide con cualquier otro tipo de movimiento se considera muerto o inmóvil (1,5,24).

Si una muestra contiene menos del 40% de espermatozoides móviles, se considera potencialmente infértil.

Si se recolectaron 2 muestras con una hora de diferencia, la segunda muestra debe tener igual o mejor motilidad que la primera, que generalmente contiene un mayor porcentaje de espermatozoides estancados (2,21,23,24,26,27).

4) Concentración espermática (millones de espermatozoides por ml).

Una vez que la motilidad se ha evaluado, se debe estimar el número de espermatozoides por ml de semen

El promedio normal en un semental es de 300 millones a 600 millones de espermatozoides /ml.(5,24).

Si se recolectan dos muestras con una hora de diferencia, la segunda muestra debe contener aproximadamente la mitad de la concentración de la primera muestra. Si la disminución es mayor al 50%, o si la concentración disminuye por varias recolecciones diarias, el semental deberá ser clínicamente examinado (5).

Existen diferentes métodos para estimar el número de espermatozoides/ ml:

- 1) Mediante el uso de un densímetro
- 2) Cámara hemocitométrica (2,5,7,24).

1) El densímetro se recomienda en granjas donde se evalúen varios sementales, por lo rápido del proceso con este aparato y por la gran inversión que representa, (5,7).

El densímetro también conocido como espectrofotómetro debe calibrarse para la evaluación del semen equino.

El conteo de espermatozoides esta basado en un sistema óptico incorporado a un rayo de luz visible que atraviesa la muestra y es registrado en un fotodetector.

La señal del fotodetector se convierte en un valor de absorbencia, que esta programado electrónicamente para

convertirlo en una medida de densidad del esperma. El número de espermatozoides/ml aparece entonces en la pantalla del aparato (1,5,24).

Si se le proporciona el porcentaje de motilidad de la misma muestra y conociendo ya el número de espermatozoides/ml, el instrumento determina también el número de espermatozoides/dosis para inseminación artificial. Si se desea estimar el volumen (ml) de semen rico en espermatozoides necesario para dar un número adecuado de espermatozoides por dosis, el aparato puede indicar el volumen que se requiere de acuerdo a los espermatozoides/ml y porcentaje de motilidad de la muestra (2,5,7).

2) Cámara hemocitométrica.

Este método consiste en hacer el conteo de células vista al microscopio.

Debido a la dificultad en el conteo de espermatozoides en muestras muy concentradas, se debe practicar una técnica de dilución (1:200) y mezclarse bien. Normalmente se utiliza el hemocitómetro de células rojas.

Se coloca una gota de la mezcla en la cámara de Neubauer (para conteo de células sanguíneas) y se pone el cubreobjetos.

Se enfoca un cuadro grande (con el objetivo 40X) y se cuenta el número de espermatozoides de 5 (cinco) cuadros de 0.02 mm, la cuenta final se multiplica por 10,000,000 para determinar el número de espermatozoides/ml (2,5).

Muchos investigadores sostienen que los estimados: número adecuado de espermatozoides/ml y el porcentaje de motilidad progresiva son las características seminales más altamente relacionadas con la fertilidad (5,9,24).

5.- Espermatozoides totales (Billones de espermatozoides/eyaculado)

Una vez que se ha determinado la concentración de espermatozoides/ml, el número total de espermatozoides/eyaculado se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l} \text{Concentración espermática} \times \text{Volumen del} = \text{Número de esper} \\ \text{(espermatozoides/ml)} \quad \text{eyaculado} \quad \text{matozoides/eya} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{(ml)} \quad \quad \quad \text{culado.} \end{array}$$

6.- Morfología:

La muestra debe contener al menos 65% de células normales. Sin embargo aunque un alto porcentaje de anomalías indica disfunción en la producción de espermatozoides y puede sugerir una subfertilidad temporal, no debe descartarse la posibilidad de errores humanos (5).

- La concentración de espermatozoides debe diluirse para que las células individuales (por lo menos 100) se observen fácilmente. Las muestras muy concentradas se pueden diluir con SSF hasta 200,000/mm³ (5).

Uno de los métodos mas utilizados es la tinción nigrosina/eosina. En este procedimiento la eosina es tomada por las células muertas y se tiñen de rosa; la nigrosina actúa como un fondo obscuro, de tal manera que los espermatozoides se proyectan contra si y su forma puede observarse (2,5,26).

Para el procedimiento se debe colocar una gota de semen por 5 de la tinción y se hace un frotis que se deja secar en la platina caliente, si se permite que la muestra se enfríe antes de secarse pueden producirse anomalías morfológicas secundarias.

Otro método es sencillamente teñir la muestra con tinta india de alto grado. La tinción provee contraste y permite distinguir la forma del espermatozoide contra un fondo obscuro. La mezcla es 1 gota de semen por 5 de tinta (5).

ESTO
SALIR
DE LA BIBLIOTECA

Una de las principales clasificaciones de la morfología de los espermatozoides es:

Normal vivos.

Normal muertos.

Decapitados (con cabeza separada) muertos.

Acrosoma nudoso.

Acrosoma edematoso.

Acrosoma suelto.

Defecto de cráter.

Separación de cuello o interrupción en la pieza media

Gota citoplasmática proximal

Gota citoplasmática distal.

Pieza media encorvada.

Enrollamiento de la cola.

Cola volteada.

Los espermatozoides vivos y los que tienen gota citoplasmática distal (vestigio o remanente de la espermátida) se suman y el total representa el porcentaje de espermatozoides considerados normales (2).

Porcentaje de vivos muertos:

Depende de la habilidad de los testículos para producir espermatozoides viables y de la habilidad del epidídimo para absorber las células muertas.

Es importante recordar que la presencia de células vivas no necesariamente indica fertilidad, porque pueden tener defectos morfológicos o de movimiento que disminuyen su capacidad (1,5).

7.- pH del semen:

La evaluación del semen incluye medir el pH (1,2,5,27)

El pH seminal varía con las estaciones, la frecuencia de los eyaculados: si se toman dos muestras con una hora de diferencia el pH de la primera muestra debe ser mayor que el de la segunda (1,2,5,21,27).

Cuando el pH es muy alcalino puede ser indicativo de contaminación con orina, infección en tracto reproductor, disfunción de glándulas accesorias o eyaculación incompleta. Los cambios en el pH alteran el delicado medio de los espermatozoides disminuyendo con ello la fertilidad. En caballos el rango normal del pH seminal es de 6.9 a 7.9.

Los métodos que se utilizan para medirlos son:

- Tiras reactivas: las más convenientes son las de mayor sensibilidad (entre 7 y 8) para que de una estimación aproximada, aunque nunca es exacta.
- Potenciómetro: es el que más se recomienda debido a la importancia de esta evaluación. Este aparato mide la concentración de iones. Debe ser calibrado con estándares (cualquier solución de pH conocido) antes de cada uso (5).

8.- Células blancas sanguíneas

Si el pH es alcalino (>7.8) y no hay presencia de orina, se pueden contar las células blancas para determinar si hay infección en el tracto reproductor.

Esta cuenta se hace similar a la que se realiza para contar espermatozoides, con microscopio.

Si hay mas de 1,500 células blancas/mm³ es posible que haya una infección que bien puede originarse desde testículos hasta el pene (5).

9.- Celulas rojas sanguíneas:

Algunos eritrocitos se observan en el semen bajo el microscopio, es normal encontrar hasta 500/mm³.

La hemospermia se asocia a exceso de trabajo o mal uso de anillos para el semental (5).

Longevidad:

Si los espermatozoides mueren muy rápido no tienen tiempo de fertilizar el óvulo.

Aunque su longevidad es diferente en el tracto de la hembra (72 hrs aproximadamente) que en un tubo de ensayo; y su bien no se conoce mucho de su vida en el útero, el siguiente estudio es una prueba efectiva en lo que corresponde a longevidad.

La longevidad se considera como el periodo de motilidad continua de una muestra sin diluir, en un recipiente estéril a temperatura ambiente. Cada hora se toma una gota de semen y se examina su motilidad, durante 8 a 10 horas.

PARAMETROS NORMALES DEL SEMEN EQUINO (2,5):

Volumen:	30 - 250 ml
Concentración	30 - 600 millones/ml
pH	6.7-7.8
Células blancas	Menos de 1,500/mm³
Eritrocitos	Menos de 500/mm³
Morfología	Al menos 65% normales.
Cuenta vivos/muertos *	65% vivos
Motilidad	Al menos 40% móviles (movimiento progresivo)
Longevidad	Al menos 40 - 50% vivos después de 3 hrs a temperatura ambiente; al menos 10% vivos después de 8 hrs a temperatura ambiente (con 2 - 5% de motilidad).

DISCUSION

La correcta elaboración y preparación de la vagina artificial refleja un mejor rendimiento del semental, mejor calidad del eyaculado, mayor cantidad de semen y menor contaminación de la muestra.

La calidad del semen equino está influenciada por muchos factores: estación del año, frecuencia de eyaculaciones, talla de los testículos, edad del animal, etc (7,9,10,12,21,25,26,27,29).

Los parámetros más importantes a evaluar y que son altamente indicativos de la capacidad reproductiva del semental son: número de espermatozoides/ml de eyaculado y el porcentaje de motilidad progresiva.

LITERATURA CITADA:

- Febiger. Philadelphia. 1974.
- 2.- Allen, W.E.: Fertility and obstetrics in the horse
Library of Veterinary Practice. Ed Blackwell Scientific
Publications. U.K. 1986.
 - 3.- Amann, R.P. and Pickett, B.W.: An overview of frozen
equine semen; Procedures for thawing and insemination of
frozen Equine spermatozoa. Colorado State University.
Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. 02. (1986).
 - 4.- Asbury, A.C. and John P. Hugnes.: Use of the Artificial
Vagina for equine semen collection. J. Am. vet med. Ass.
144: 879-882. (1964).
 - 5.- Equine Research: Breeding Management and Foal
Development. Ed. Equine Research. U.S.A. 1982.
 - 6.- Cahill, C: Managment of the Thoroughbred Stallion.
Procc. 25th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr. Miami
beach, Fla. December 1979: 51-60. Am. Ass. of Equine
Practnr. Toronto. 1979.
 - 7.- Cooper, W.L.: Artifitial breeding of horse. Vet. Clin. of
North Am., Equine Practice. Ed. W.B. Saunders Co.
Philadelphia. 2: 2. 267-275. (1980).
 - 8.- Depew, C.G: Maximizing breeding efficiency. J. Eq. Vet.
Sci. 9: 111. (1970).

- 9.- Dowsett, K.F. and Pattie, W.A.: Characteristics and fertility of Stallion semen. J. Reprod. Fert. Suppl. 32: 1-8. (1982).
- 10.- Dowsett, K.F. and Pattie, W.A.: Collection of semen from Stallion at stud. Aust. Vet. J. 56: 373-378. (1980).
- 11.- Dukes, H.H.: Dukes' Physiology of Domestic Animals. 10th edition. Ed. Melvin J. Swenson. London. 1984.
- 12.- Galina, C., Saltiel, A., Valencia, J., Becerril, J., Bustamante, G., Calderón, A., Duchateau, A., Fernández, S., Olguín, A., Páramo, R., Zarco, L.: Reproducción de animales domésticos. Ed Limusa. México, D.F. 1986.
- 13.- Hillman, R.B., Olar, T.T., Squires, E.L. and Pickett, B.W.: Temperature of the Artificial Vagina and Its effects on seminal quality and behavioral characteristics of Stallion. J. Am. vet. med. Ass. 177: 720-722. (1980).
- 14.- Kenney, R.M and Cooper, W.L.: Therapeutic use of a phantom for semen collection from a Stallion. J. Am. vet. med. Ass. 165: 706-707. (1974).
- 15.- Loomis, P.R.: Techniques and applications of Artificial Insamiation with frozen equine semen. Eq. Vet. Sci. Theriogenology. 6: 139-142. (1985).
- 16.- Mc Donald, L.E.: Veterinary endocrinology and Reproduction. 3ra Ed., Ed. Lea and Febinger. Philadelphia. 1978.

- 17.- Medina, O.V.: Comparación de la fertilidad obtenida con inseminación artificial utilizando semen frío transportado y monta natural en equinos. Tesis. M.V.Z. U.N.A.M. Mxico, (1989).
- 18.- Meriland, C. P. and Loch, W.E.: The effect of Artificial Vagina liners on livability of stallion spermatozoa. Eq. Vet. Sci. Theriogenology. 7: 226-228. (1984).
- 19.- Pace, M.M. and Sullivan, J.J.: Effect of Timing of Insamination, number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rates in mares inseminated with frozen Stallion semen. J. Reprod. Fert. Suppl. 23: 115-121. (1975).
- 20.- Pattie, W.A. and Dowsett.: The repeatability of seminal characteristics of Stallions. J. Reprod. Fert. Suppl. 32: 9-13. (1982).
- 21.- Pickett, B.W.: Factors affecting Stallion managment. Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, treatment and prevention of reproductive deseases in animals. Ed .W.B. Saunders Company. U.S.A. (1980).
- 22.- Pickett, B.W., Amann, R.P., Mc Kinnon, A.O., Squires, E.L. and Voss, J.L.: Managment of the Stallion for maximum reproductive efficiency, II. Colorado State University. Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. 05 (1989).
- 23.- Pickett, B.W., Gebauer, M.R., Seidel Jr., G.E., Voss, J.L.: Reproductive phisiology of the Stallion spermatozoal losses in the colection equipment and gel. J. Am. vet. med. Ass., 165: 706-708. (1974).

- 24.- Pickett, B.W., Squires, E.L. and Mc Kinnon, A.D.:
Procedures for collection, evaluation and utilization of
Stallion semen for Artificial Insemination. Colorado
State University. Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. 03.
(1987).
- 25.- Pickett, B.W., Squires, E.L., Voss, J.L. and Wallach,
J.R.: Factors affecting sexual behaviour of the equine
male. Procc. 25th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr.
Miami beach, Fla. December 1979. 61-112. Am. Assoc.
Equine Practnr. Toronto. 1979.
- 26.- Rousset, H., Magistrini, M. and Palmer, E.: Assesment of
fertility and semen evaluations of Stallions. J. Reprod.
Fert. Supl., 35: 25-31. (1987).
- 27.- Squires, E.L., Pickett, B.W. and Amann, R.P.: Effects of
succesive ejaculation on Stallion seminal
characteristics. J. Reprod. Fert. Supl. 27:7-12. (1979).
- 28.- Strzemienski., Sertich, P.L., Varner, D.D and Kenney,
R.M.: Evaluation of cellulose acetate/nitrate filters
for the study of Stallion sperm motility. J. Reprod.
Fert. Suppl., 35:33-38. (1987).
- 29.- Sullivan, J.J. and Pickett, B. W.: Influence of
ejaculation frequency of Stallion on characteristics of
semen and output of spermatozoal. J. Reprod. Fert.
Suppl. 23: 29-34. (1975).

- 30.- Voss, J.L., Squires, E.L., Pickett, B.W. and Amann, R.P.: Factors affecting reproductive performance of the Stallion. Procc. 25th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr., Miami beach, Fla., December 1979: 31-50. Am. Assoc. Equine Practnr. Toronto. (1979).