



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE
CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO CON UN DILUYENTE COMERCIAL

TESIS QUE PRESENTA
MARCELO GONZALEZ RENTERAL
PARA OBTENER TITULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR:
DR. DANIEL VAL ARREOLA
COASESORAS
MVZ. IRMA ARCELIA TOSCANO TORRES
MVZ. INGRID BRENDA OLIVO ZEPEDA

MORELIA, MICHOACÁN; SEPTIEMBRE 2013



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE
CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO CON UN DILUYENTE COMERCIAL

TESIS QUE PRESENTA
MARCELO GONZALEZ RENTERAL

PARA OBTENER TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR:

DR. DANIEL VAL ARREOLA

COASESORAS

MVZ. IRMA ARCELIA TOSCANO TORRES

MVZ. INGRID BRENDA OLIVO ZEPEDA

MORELIA, MICHOACÁN; SEPTIEMBRE 2013

U.M.S.N.H.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

PROGRAMA ACREDITADO



www.vetzoo.umich.mx

Aprobación de Impresión del Trabajo

Morelia, Michoacán, a 5 de Septiembre de 2013

C. MC. ORLANDO ARTURO VALLEJO FIGUEROA


Director de la FMVZ-UMSNH

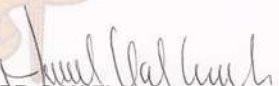
PRESENTE.

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: "VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO CON UN DILUYENTE COMERCIAL", del P. MVZ. MARCELO GONZÁLEZ RENTERAL, dirigida por el asesor DR. DANIEL VAL ARREOLA, fue *revisada y aprobada* por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE

DR. MANUEL JAIME TENA MARTÍNEZ
PRESIDENTE


MC. ISIDORO MARTÍNEZ BEIZA
VOCAL


DR. DANIEL VAL ARREOLA
VOCAL (ASESOR)

UNIDAD ACUEDUCTO

Av. Acueducto y Tzintzuntzan
Col. Matamoros C.P. 58130
Morelia, Michoacán
Teléfono y FAX: (01443) 314 1463
C.E. direccion@urantia.vetzoo.umich.mx
subdireccion@urantia.vetzoo.umich.mx

UNIDAD POSTA

Carretera Morelia-Zinapecuaro Km. 9.5
Teléfono: (01443) 312 5236 FAX: 312 4176
Municipio de Tarimbaro, Michoacán
C.E. secretario.academico@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.administrativo@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.tecnico@urantia.vetzoo.umich.mx

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es resultado de un gran esfuerzo de equipo de trabajo; agradezco al Dr. Daniel Val Arreola por su asesoría en esta investigación; a mis sinodales que en todo este proceso estuvieron al pendiente proporcionándome sus observaciones y correcciones.

A las Dras. Ingrid Brenda Olivo Zepeda e Irma Arcelia Toscano Torres por capacitarme para llevar a cabo este trabajo.

También agradezco a la FMVZ-UMSNH por prestarme el espacio y equipo necesario para la realización del presente trabajo.

Agradezco a mis padres y a mis hermanos por apoyarme durante mi formación profesional.

Índice

1. Resumen	10
2. Introducción.....	11
3. Antecedentes	13
3.1. Conservación del semen equino	14
3.1.1. Conservación del semen en refrigeración.....	15
3.1.2. Crioconservación del semen equino	16
3.1.3. Crioprotectores	21
3.1.4. Centrifugación.....	22
4. Marco de estudio.....	23
4.1. Justificación.....	23
4.2. Planteamiento del problema	24
4.3. Objetivo general	24
4.3.1. Objetivos específicos	24
4.4. Hipótesis	25
5. Material y métodos	25
5.1. Ubicación	25
5.1.1. Características de los garañones.....	25
5.2. Colecta y evaluación del semen fresco.....	26
5.2.1. Colecta de semen	26

5.2.2. Evaluación macro y microscópica del semen	26
5.3. Preparación del diluyente, Dilución y Congelación del semen.....	28
5.3.1. Preparación de diluyente	28
5.3.2. Dilución de semen para la centrifugación	30
5.3.3. Dilución del semen para la congelación.....	30
5.3.4. Congelación del semen	31
5.3.5. Evaluación de la movilidad progresiva y viabilidad de los espermatozoides	31
6. Resultados y discusión.....	32
7. Conclusiones.....	37
8. Bibliografía	38

índice de cuadros

Cuadro 1. Componentes químicos del EZ Mixin “BF” (Province et al., 1984).	16
Cuadro 2. Diluyente de Kenney o diluyente NFDSM ² glucosa (Kenney et al., 1975).	16
Cuadro 3. Composición química del E-Z Freezin “LE” ® (Salamon et al., 2000)	18
Cuadro 4. Composición química del INRA 96® (Pineda el at., 2007)	19
Cuadro 5. Composición química del Triladyl ® (Minitube, 2012).....	20
Cuadro 6. Rangos aceptables para los parámetros normales del semen del semental equino (Morel, 2005).	28
Cuadro 7. Composición química del Triladyl ® (100 ml) y del Ez-Freezin “LE” ® (15 ml) (Salamon et al., 2000).	29
Cuadro 8. Motilidad post-descongelación en dos diluyentes comerciales Triladyl® y Ez-Freezin® con diferentes protocolos de centrifugación.	32
Cuadro 9. Viabilidad pos-descongelación en dos diluyentes comerciales con diferentes protocolos de centrifugación.....	33
Cuadro 10. Composición química de ambos diluyentes en proporción a 1 ml	35

1. Resumen

En el presente estudio se determinó la motilidad y viabilidad del semen criopreservado. Se utilizaron tres garañones adultos de la raza cuarto de milla obteniendo un eyaculado por garañón. Se utilizó como diluyente para centrifugar/transportar el Ez-Mixin® en proporción 1:1 diluyente-semen y para congelar el Triladyl® con yema de huevo al 20 % (diluyente originalmente utilizado en la criopreservación de semen bovino) y el Ez-Freezin Le® (diluyente especialmente para la criopreservación del semen equino) con dos protocolos de centrifugación 1) 900 rpm X 5 minutos y 2) 1800 rpm X 5 minutos; Se centrifugaron 2 muestras con cada uno de los protocolos. Una vez eliminada la porción gelosa el semen fue resuspendido en Triladyl® y Ez-Freezin Le® en proporción 1:1. Se envaso en pajillas de 0.5 ml; el semen fue refrigerado una hora para posteriormente congelarlo en nitrógeno líquido. El Triladyl® con el protocolo de 900 rpm durante 5 minutos mostraron mejores resultados postdescongelación en comparación con el Ez-Freezin Le® por lo que puede ser un diluyente económicamente viable capaz de criopreservar el semen equino.

2. Introducción

La aceptación del uso del semen criopreservado para la inseminación artificial por las diferentes asociaciones de criadores de équidos en diversos países del mundo ha adquirido gran importancia en la última década, debido a los beneficios que ofrece esta biotecnología. Entre estos se destacan la conservación del material genético de los ejemplares sobresalientes, la distribución a nivel mundial y así mismo controlar las enfermedades venéreas (Loomis, 2001).

La criopreservación del semen equino busca reducir o detener el metabolismo del espermatozoide y prolongar su vida fértil. Existen dos métodos de conservación: 1) En estado líquido, en refrigeración (0° a 15°C), y 2) criopreservado (-196°C) (Salamon y Maxwell, 2000).

La utilización de semen en estado líquido (5 °C) es de aproximadamente 96 horas (Wilde *et al.*, 1990), un periodo muy corto que limita el uso de sementales de alto valor genético de manera más amplia. En cambio, el uso de semen congelado ha tenido gran impacto en la industria equina y dentro de sus ventajas se mencionan las siguientes: es más económico transportar el semen en termos criogénicos, que trasladar las yeguas para ser cubiertas y además se conserva el material genético por tiempo indefinido (Samper *et al.*, 2001).

La utilización de los diluyentes para la criopreservación del semen equino es de gran importancia ya que estos aportan los nutrientes necesarios para la sobrevivencia del espermatozoide y así mismo tener la capacidad de fecundidad. Sin embargo, en la actualidad la disposición de diluyentes económicamente viables para el semen equino aún está limitada. Tal es el caso del Triladyl®, no obstante de ser un diluyente específico para bovinos, sí se empleara para la criopreservación de semen equino presentaría ventajas económicas ya que es posible congelar hasta 41.66 eyaculados

con un promedio de 30 ml por cada eyaculado; considerando el costo del Triladyl® de \$755.35 (Minitube de México, S. de R.L. de C.V) por lo tanto el costo de conservación por cada eyaculado sería de \$18.13 pesos mientras que el Ez-Freezin LE®, el cual es un diluyente específico para la criopreservación de semen equino, sí se considera un sobre de 15 ml, al diluirse con el semen en proporción 1:1, sólo es posible conservar un solo eyaculado con un costo de \$545.20 (Urev S.A de C.V).

El presente trabajo tiene como objetivo validar un protocolo de congelación y descongelación de semen equino empleando el diluyente comercial Triladyl® este diluyente en un estudio previo fue utilizado con resultados aceptables en la criopreservación de semen equino.

3. Antecedentes

Por muchas décadas, el desarrollo y utilización de la inseminación artificial en los équidos, principalmente con semen congelado, estuvo limitado por imposiciones de muchas asociaciones de criadores que no permitían su utilización (Samper, 2007). Recientemente, las legislaciones de las asociaciones de criadores de équidos en diversos países del mundo se han ido flexibilizando, permitiendo el registro de productos oriundos de esta biotecnología, originando un gran impacto en la industria ecuestre, especialmente en EEUU (Loomis, 2006), Europa (Aurich y Aurich, 2006) y Brasil (Papa *et al.*, 2005). Por ejemplo, la Asociación Americana del Caballo Cuarto de Milla y la Asociación Americana de Paint Horse permitieron la utilización del semen congelado a partir del año 2000, y estas dos asociaciones responden por cerca de 5.1 millones de caballos registrados.

Es así que el mercado de semen congelado de los équidos se ha venido valorizando a nivel mundial de manera importante. En México en los últimos años, la práctica de la Inseminación Artificial (I.A) con semen congelado, ha ganado popularidad entre los propietarios de caballos, esto les ha permitido mejorar la calidad genética de los animales, utilizando semen de garañones con un alto valor genético. Aunado a esto, prácticamente todas las Asociaciones, (a excepción de la Asociación Colombiana de Criadores de Caballos), permiten registrar a los potros nacidos por medio de la I.A. con semen refrigerado ó congelado (Quijano, 2013).

3.1. Conservación del semen equino

Las primeras investigaciones realizadas sobre la conservación del semen fueron descritas por Spallanzani en 1780 al inseminar una perra con semen fresco con buenos resultados; la perra parió cinco cachorros. En la reproducción equina la utilización del semen criopreservado se inició por Baker y Cardier (1957) logrando la primera gestación con semen criopreservado en una yegua.

Un diluyente es una solución acuosa que contiene los nutrientes necesarios para mantener la supervivencia de los espermatozoides (Gadea, 2003). La yema de huevo y el glicerol son los componentes adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura.

Los substratos metabolizables como glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas (Brinsko y Varner, 1992). El metabolismo de los espermatozoides produce sustancias tóxicas como el ácido láctico, que reduce la motilidad. Los diluyentes deben contener sustancias con alta capacidad tampón para neutralizar las toxinas producidas por el metabolismo del espermatozoide (Katila, 1997).

Los antibióticos son adicionados en forma rutinaria a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección. Los antibióticos más empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la gentamicina o ampicilina, la estreptomycinina o penicilina G-potásica o sódica cristalina.

Los métodos de criopreservación del semen buscan reducir o detener el metabolismo del espermatozoide y así prolongar su vida fértil. Existen dos métodos de conservación: 1) En estado líquido en refrigeración (0° a 15°C), y 2) criopreservado (-196°C) (Salamon y Maxwell, 2000).

3.1.1. Conservación del semen en refrigeración

Sí el semen va a ser diluido antes de su utilización, debe hacerse lo antes posible (Ginther, 1992). Se han desarrollado varios diluyentes basados normalmente en la utilización de leche, gelatina ó yema de huevo con antibióticos (Squires *et al.*, 1981; Varner, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Ijaz y Ducharme, 1995; Lawson y Morel, 1996). Todos estos diluyentes proporcionan unas tasas de fertilización aceptables con el semen refrigerado.

El semen diluido puede guardarse hasta 2-3 días si se diluye en una proporción de 2:1, semen: diluyente y se enfría despacio hasta 4-8 °C en un periodo de 4 horas y se mantienen a esta temperatura hasta su utilización (Hughes *et al.*, 1970; Allen *et al.*, 1976). Dicho tratamiento permite un transporte limitado y el almacenamiento en un frigorífico ó un Equitainer (contenedor para el transporte del semen), siempre que la temperatura se mantenga a 4 °C.

Así mismo existen algunos diluyentes comerciales los cuales han sido evaluados en diferentes trabajos; dentro de los más utilizados esta el EZ-Mixin y el Kenney.

Orozco *et al.* (2011) evaluó, el EZ-Mixin el cual esta formulado a base de glucosa y leche descremada en polvo (Cuadro 1), para refrigerar semen de caballo peruano de paso encontrando una movilidad del 32.71 % a las 24 horas.

Cuadro 1. Componentes químicos del EZ Mixin “BF” (Province *et al.*, 1984).

Componente	Cantidad
Leche descremada en polvo (g)	2.4
Glucosa monohidrato (g)	4.9
Agua destilada (ml)	100
Osmolaridad (mOsmol/kg)	375
pH	6.99

Otro diluyente para refrigerar semen es el Kenney que está compuesto por leche descremada en polvo, glucosa bicarbonato de sodio, antibióticos y agua desionizada (Cuadro 2). Se realizó un estudio en Colombia en donde se diluyó el semen de burros para inseminar yeguas obteniendo el 54.5 % de fertilidad (Boeta y Zarco, 2000).

Cuadro 2. Diluyente de Kenney o diluyente NFDSM² glucosa (Kenney *et al.*, 1975).

Componente	cantidad
Leche descremada desecada no grasa (g)	2.4
Glucosa (g)	4.9
Sulfato de gentamicina (mg)	100
8.4 % NaHCO ₃ (ml)	2
Agua desionizada (ml)	92

3.1.2. Crioconservación del semen equino

La criopreservación del semen equino en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides se degeneran con cierta rapidez debidos principalmente al agotamiento de las reservas energéticas.

La inseminación artificial con semen congelado en equinos es una biotecnología reproductiva que se empezó a practicar a partir del año 2000 ya que diversas asociaciones no permitían su uso; gracias a esta biotecnología se ha ido mejorando la genética equina. Sin embargo, su éxito depende en gran medida de que el semen utilizado pueda mantener su poder fecundante post-descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de criopreservación (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Cualquier protocolo de congelación seminal incluye cinco pasos principales:

- Dilución y adición del crioprotector.
- Enfriamiento y envasado.
- Congelación
- Almacenamiento
- Descongelación

El almacenamiento prolongado del semen solo se puede conseguir con la criopreservación, pero esta técnica en el caso del semen de los équidos no se han refinado tanto como en el caso del ganado vacuno (Morel, 2005).

Se han ensayado numerosos diluyentes, basados en los compuestos indicados en los Cuadro 3 y 4. La mayoría son parecidos a los utilizados para la inseminación con

semen refrigerado, pero con la adición de un crioprotector, como el glicerol o en su caso la yema de huevo.

El Ez-Freezin “LE” es un diluyente específico para ser usado en la criopreservación del semen equino; es una fórmula que contiene EDTA lactosa y el antibiótico ticarcilina. En la evaluación de este diluyente se ha encontrado el 26% de movilidad post-descongelación y una viabilidad del 74% (Ávila, 2009).

Cuadro 3. Composición química del E-Z Freezin “LE” ® (Salamon *et al.*, 2000)

Componente	Cantidad
Yema de huevo (g)	2.5
Lactosa (g)	6.6
Glucosa (g)	0.7
Citrato de sodio (g)	0.16
Bicarbonato de sodio (g)	0.015
EDTA disódico (g)	0.15
Glicerol (ml)	3.5
Ticarcilina disódica (g)	0.15

EDTA: ácido etilendiamina tetraacético.

Otro diluyente utilizado es el INRA 96® (Cuadro 4), este es un diluyente comercial que contiene glucosa, lactosa, rafinosa, citrato de sodio, citrato de potasio, hepes,

dimetilformamida, yema de huevo, gentamicina y penicilina; diseñado especialmente para la congelación de semen equino. En un trabajo realizado por Pineda *et al.* (2007) encontró el 57.48% de movilidad postdescongelación.

Cuadro 4. Composición química del INRA 96® (Pineda *et al.*, 2007)

Componente	Cantidad
Glucosa (g)	25
Lactosa (g)	1.5
Rafinosa (g)	1.5
Citrato Na (g)	0.25
Citrato K (g)	0.41
Hepes (g)	4,7
Dimetil formamida (%)	4
Yema de huevo (%)	2
Gentamicina (µg/ml)	10
Penicilina (UI/ml)	10

El Tryladil® es un diluyente comercial que contiene agua bidestilada, glicerol, TRIS (hidroximetil aminometano), ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, espectinomina y lincomicina; el cual se mezcla con yema de huevo en una proporción de 1:1. Este diluyente fue desarrollado originalmente para la conservación del semen bovino (Minitube, 2012).

Sin embargo, el Triladyl® se ha usado para criopreservar semen de diferentes especies domesticas obteniendo los siguientes resultados: En bovinos una movilidad

del 30.86 % (Carballo, 2005); En perros el 50% de motilidad (Szasz *et al.*, 2000); En ovinos 40% y 60-85 % de movilidad y viabilidad, respectivamente (Sánchez *et al.*, 2006) y en equinos 40 % de movilidad y 75 % de viabilidad (Ávila, 2009).

Cuadro 5. Composición química del Triladyl® (Minitube, 2012).

Componente	Cantidad
Agua bidestilada (ml)	60
Glicerol (g)	3.63
TRIS (hidroximetil aminometano) (g)	1.99
Acido cítrico (g)	0.50
Fructosa	100,000
Tilosina (mg)	5
Gentamicina (mg)	25
Espectinomicina (mg)	30
Lincomicina (mg)	15

3.1.3. Crioprotectores

Para optimizar la supervivencia celular, se añaden crioprotectores al medio de criopreservación. Son solutos orgánicos que protegen la membrana celular, núcleo y orgánulos citoplasmáticos durante el almacenamiento de larga duración en nitrógeno líquido. Son esenciales para mantener la viabilidad de la mayoría de las células criopreservadas (Mazur, 1984).

Existen dos grupos de Crioprotectores: los intracelulares o permeables, y los extracelulares o no permeables. Los intracelulares son sustancias de bajo peso molecular que penetran fácilmente la célula, reemplazando el agua intracelular por medio de la introducción de radicales hidroxilo. Estos reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento y disminuyen el punto de congelación del agua (Medeiros *et al.*, 2002), lo que combinado con una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo. Son esencialmente alcoholes (glicerol, etilenglicol, 1-2 propanediol, propilenglicol) (Neira *et al.*, 2007).

Los crioprotectores extracelulares son los que ejercen su acción protegiendo el exterior de la membrana celular que es frecuentemente lesionada por el efecto de las altas concentraciones iónicas; además algunas de estas moléculas tienen un efecto reparador de membrana, gracias a los lípidos que contienen (Whittingham, 1971). Pueden ser de bajo peso molecular como sacarosa, glucosa, manitol, trealosa y rafinosa, las cuales aumentan la presión osmótica extracelular produciendo la deshidratación de la célula (Macgann, 1978); o de alto peso molecular como el polivinil - pirrolidona, el Dextran, el suero de albumina bovina, algunos aminoácidos como la L-glutamina, histidina y glicina-betaína (Neira *et al.*, 2007).

El crioprotector más ampliamente utilizado en la congelación del semen equino es el glicerol, este actúa a nivel intra y extracelular; en el medio interno mantiene la integridad de las proteínas previniendo la desnaturalización de las membranas pero también disminuyendo la fluidez y en el medio externo aumenta la osmolaridad favoreciendo así la deshidratación celular, aumenta el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas, disminuye la concentración de sales en el medio externo y aumenta el tamaño de los canales de agua descongelada (Serres y Álvarez., 2006).

Krause y Grove (1967) evaluaron diluyentes a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, obteniendo motilidades después del descongelamiento de 50 a 70%, con resultados de fertilidad muy variables.

Los primeros datos sobre fertilidad de semen equino descongelado con algunos de estos crioprotectores, como el etilenglicol, indican una fertilidad en yeguas de entre el 60% y el 80%. En un estudio realizado por Palacios y Zarco (1992) reportaron el 29.39 % de la motilidad post-descongelación del semen equino diluido en yema de huevo.

3.1.4. Centrifugación

El método más utilizado para la separación del plasma seminal de la fase rica en espermatozoides es la centrifugación. La misma permite además de la separación del plasma, aumentar la concentración espermática y también ofrece un mayor control de la dilución utilizada en el semen enfriado ó congelado. Sin embargo, la centrifugación produce ciertos daños en la célula espermática (Brass, 2001).

Como tal, el efecto negativo de la centrifugación sobre el plasma seminal se puede reducir. Considerando que una pequeña porción del plasma seminal mejora la movilidad de los espermatozoides después de la refrigeración y al almacenamiento, se emplea la centrifugación del semen diluido, posteriormente éste es resuspendido en un extensor con el propósito de reducir aún más la cantidad de plasma seminal en muestras almacenadas (Hoogewijs *et al.*, 2010). Se han descrito diferentes protocolos para llevar a cabo este proceso, en donde el protocolo de centrifugación más comúnmente empleado es de 600 rpm durante 10 minutos (Weiss *et al.*, 2004); sin embargo la literatura mencionan protocolos desde las 600 rpm durante 10 minutos hasta las 2400 rpm con una disminución del tiempo de 5 minutos.

4. Marco de estudio

4.1 Justificación

Debido a la reciente aceptación de la congelación de semen equino por diferentes asociaciones ecuestres a nivel mundial, esta biotecnología ha tenido gran impacto en la industria equina ya que permite conservar el material genético por tiempo indeterminado reduciendo los costos de transporte, estrés, transmisión de enfermedades venéreas y accidentes que la hembra pueda producir al macho durante la monta. De acuerdo a las tasas aceptables de movilidad obtenidas con el Triladyl® en diferentes especies, este diluyente pudiera ser una alternativa económicamente viable y eficaz en la congelación de semen equino.

4.2 Planteamiento del problema

El uso de la inseminación artificial con semen congelado en equinos no ha tenido los avances logrados como en otras especies como es el caso de los bovinos y cerdos por lo que es necesario validar un protocolo de congelación y descongelación usando diluyentes económicamente viables; tal es el caso del Triladyl®, no obstante es específico para su empleo en bovinos, se ha reportado trabajos en donde se ha empleado con resultados aceptables en la congelación de semen equino. Así mismo, es importante identificar un protocolo de centrifugación que permita la eliminación del plasma seminal sin que se produzca un efecto dañino sobre el espermatozoide equino.

4.3. Objetivo general

- Validar un protocolo de congelación y descongelación de semen equino usando un diluyente comercial.

4.3.1 Objetivos específicos

- Comparar el uso del Triladyl para ser aplicado como diluyente en equinos con un diluyente comercial específico para equinos.
- Identificar el mejor protocolo de centrifugación que permita obtener parámetros aceptables de viabilidad y motilidad de semen equino.

4.4. Hipótesis

El uso correcto de un protocolo de congelación de semen equino usando un diluyente comercial permitirá obtener parámetros aceptables de viabilidad y motilidad al momento de la descongelación. Por otro lado, al identificar un protocolo apropiado de centrifugación es posible obtener mejores resultados post-descongelación del semen equino.

5. Material y métodos

5.1 Ubicación

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, ubicada en el km 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro y la granja de equinos se localiza en el Municipio de Lagunillas, Michoacán.

5.1.1. Características de los garañones

Se obtuvieron 3 muestras de semen fresco de tres garañones de la raza cuarto de milla, adulto con experiencia reproductiva, con un calendario regular de desparasitación y vacunación y alojado en caballeriza individual.

5.2. Colecta y evaluación del semen fresco

5.2.1 Colecta de semen

La colecta se realizó con una vagina artificial modelo Hannover (Figura 1) la cual está compuesta por un tubo rígido, camisa interna de látex y un tubo colector del semen. Para la preparación se le agregaron 3 litros de agua, la temperatura interna de la vagina debe estar entre 45 – 50 °C (Blanchard *et al.*, 2003), se lubricó y se aseguró que tuviera la presión necesaria para la estimulación del garañón. Para la recolección se utilizó una yegua en estro para estimular al garañón.



Figura 1.vagina artificial tipo Hannover

5.2.2 Evaluación macro y microscópica del semen

En la evaluación macroscópica se determinó el volumen, color, consistencia y olor. En la microscópica se evaluó, la movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad,

mortalidad, concentración espermática y anormalidades morfológicas (Hafez y Hafez, 2000).

Movilidad masal: Inmediatamente una vez que se obtuvo el eyaculado se procedió a evaluar la movilidad masal con un microscopio compuesto con el objetivo de 10X, colocando una gota de semen en un portaobjeto para así mismo evaluarlo obteniendo un promedio de 4.

Movilidad progresiva: Una vez realizada la valoración masal se colocó una gota de semen en un portaobjeto y sobre la gota se le colocó un cubre objetos para realizar la valoración individual de los espermatozoides obteniendo un promedio de 77 %.

Viabilidad y morfología: se realizó mediante un frotis; se colocó una gota de semen en un portaobjetos, posteriormente se agregó una gota de tinción eosina-nigrosina se homogenizó la gota de semen fresco con la tinción y finalmente se deslizo con otro portaobjeto para realizar el frotis obteniendo un promedio de 85 %.

Concentración espermática: se determinó con una cámara de Neubauer, se realizó la dilución de semen; en una parte de semen por 200 partes de agua común con una pipeta de toma y finalmente se agregó una gota con el semen diluido, en cada uno de los surcos de la cámara de Neubauer.

Cuadro 6. Rangos aceptables para los parámetros normales del semen del semental equino (Morel, 2005).

Parámetro	Rango aceptable
Volumen de esperma producido	30-250 mL
Concentración del esperma	30-600 × 10 ⁶ /mL
Morfología	Mínimo 40-50 % fisiológicamente normal
Motilidad	Mínimo 40 % esperma móvil progresivamente
Longevidad a temperatura ambiente	45 % vivos después de las 3 h 10 % vivos después de las 8 h
pH	6.9-7.8

5.3 Preparación del diluyente, Dilución y Congelación del semen

5.3.1 Preparación de diluyente

Para preparar 100 ml de Triladyl® se agrego lo siguiente:

- 60 ml de agua bidestilada.
- 20 gramos de yema de huevo
- 20 ml de Triladyl®.
- Se mezcló suavemente y se calentó a 30 °C.
- Se filtró el medio antes de añadir el semen.

El Ez-Freezin “LE”® se descongeló a 22 °C y se diluyó con el semen en proporción 1:1.

Cuadro 7. Composición química del Triladyl® (100 ml) y del Ez-Freezin “LE”® (15 ml) (Salamon *et al.*, 2000).

Triladyl®	Cantidad	Ez-Freezin	Cantidad
Agua bidestilada	60 ml	Yema de huevo	2.5 g
Glicerol	3.63 g	Lactosa	6.6 g
Tris	1.99 g	Glucosa	0.7 g
Ácido cítrico	0.50 g	Citrato de sodio	0.16 g
Fructuosa	100,000	Bicarbonato de sodio	0.015 g
Tilosina	5 mg	EDTA disódico	0.15 g
Gentamicina	25 mg	Glicerol	3.5 ml
Espectinomicina	30 mg	Ticarcilina disódica	0.15 g
lincomicina	15 mg		
Yema de huevo	20 g		

5.3.2. Dilución de semen para la centrifugación

Una vez realizada la evaluación macroscópica y microscópica del semen, éste fue diluido en un extensor comercial (E-Z MIXIN® animal reproduction systems) especialmente para la centrifugación/transporte del semen en proporción 1:1, se utilizaron 4 muestras con dos protocolos de centrifugación; 1) 900 rpm durante 5 min y 2) 1800 rpm durante 5 min, con el objetivo de separar la parte rica de espermatozoides del eyaculado de la parte gelosa; el plasma seminal ubicado en la superficie del tubo fue retirada en su totalidad dejando únicamente la pastilla de semen para ser nuevamente resuspendida con el diluyente especial para la congelación ya sea en Triladyl® ó Ez-Freezin®.

5.3.3 Dilución del semen para la congelación

Una vez que el semen fue resuspendido en Triladyl® ó en Ez-Freezin® este fue inmediatamente empaquetado en pajillas de 0,5 ml y selladas con alcohol polivinílico, con una concentración de 100×10^6 , estas pajillas fueron previamente identificadas con el nombre del garañón, dichas pajillas se colocaron en grupo de cinco en cada gobelet y almacenados a una temperatura de 5°C durante 1 hora (Neira *et al.*,2007), periodo en el cual los espermatozoides se estabilizaron para resistir al shock térmico durante el proceso de congelación.

5.3.4 Congelación del semen

El semen, una vez que pasó una hora como tiempo de equilibrio, fue congelado mediante la exposición de las pajillas a vapor de nitrógeno durante aproximadamente 15 minutos (Medeiros *et al.*, 2002), para posteriormente ser sumergidas en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C durante 2 a 3 minutos, y almacenadas en un termo criogénico de 20 Litros.

5.3.5. Evaluación de la motilidad progresiva y viabilidad de los espermatozoides pos-descongelado

La evaluación de la movilidad y de la viabilidad de los espermatozoides de ambos diluyentes en el presente estudio se realizó previa descongelación del semen almacenado en nitrógeno líquido a -196°C . Las pajillas se descongelaron a intervalos de 3 días, se tomaron 3 pajillas de cada tratamientos (Triladyl® y Ez-Freezin®) y se sacaron del termo criogénico para posteriormente introducir las a baño maría a 37°C durante 30 segundos (Arruda, 2000). La información se analizó utilizando técnicas de estadística descriptiva y comparación de medias, para tal efecto se empleó el paquete estadístico SPSS®.

6. Resultados y discusión

Se analizó la motilidad y la viabilidad pos-descongelación del semen equino con dos diluyentes comerciales (Triladyl® y Ez-Freezin®) con sus respectivos protocolos de centrifugación 900 rxm y 1800 rxm durante 5 minutos observando mejores resultados pos-descongelación de motilidad progresiva del 41.11 espermatozoides por cada 100 contados con el triladyl® con el protocolo de centrifugación de 900 rxm durante 5 minutos y con el Ez-Freezin® se encontró una motilidad del 32.78 de espermatozoides por cada 100 contabilizados con el protocolo de 900 rxm durante 5 minutos. En el cuadro 2 se observan diferencias significativas entre los dos diluyentes ($P < 0.01$), en el caso del Triladyl hubo una mayor variabilidad (3.33%) con respecto al EZ-Freezin (2.63%).

Cuadro 8. Motilidad post-descongelación en dos diluyentes comerciales Triladyl® y Ez-Freezin® con diferentes protocolos de centrifugación.

Diluyente	Protocolo de centrifugación 900 rxm			Protocolo de centrifugación 1800 rxm		
	Promedio	D.E.	C.V	Promedio	D.E	CV
Triladyl	41.11 ^{ac}	3.33	8.11	35.00 ^{ad}	3.54	10.10
Ez-Freezin	32.78 ^{bc}	2.64	8.03	29.44 ^{bd}	3.00	10.20

^{ab} indica diferencias significativas entre diluyentes ($p < 0.01$)

^{cd} indica diferencias significativas entre protocolos de centrifugación ($p < 0.005$)

Samper *et al.* (1998) indica que el parámetro más ampliamente utilizado como predictor de fertilidad para la inseminación artificial en los caballos es la motilidad

individual de los espermatozoides después de su descongelación, en los informes existentes indican una motilidad aceptable del 30-35 % lo cual los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango.

En un trabajo realizado por Hernández *et al.* (2012) obtuvieron un promedio de la motilidad de de 26.3 %, estos autores lo consideraron como un valor aceptable; dicho valor coincide con el rango proporcionado por Schulman *et al.* (2003) un valor de 29 - 40 %, el cual lo recomienda para poder ser empleado en programas de inseminación artificial.

Cuadro 9. Viabilidad pos-descongelación en dos diluyentes comerciales con diferentes protocolos de centrifugación

Diluyente	Protocolo de centrifugación 900 rxm			Protocolo de centrifugación 1800 rxm		
	Promedio	D.E	C.V	Promedio	D.E	C.V
Triladyl	60.44 ^{ac}	6.77	11.19	42.67 ^{ad}	9.35	21.92
Ez-Freezin	44.44 ^{bc}	8.86	19.97	39.44 ^{bd}	8.31	21.06

^{ab} indica diferencias significativas entre diluyentes (p<0.01)

^{cd} indica diferencias significativas entre protocolos de centrifugación (p<0.005)

Heise *et al.* (2011) indica que la viabilidad post-descongelación de espermatozoides de garañón es del 60 %. Lo que concuerda con el estudio realizado por Hernández *et al.* (2012) que encontraron un porcentaje de viabilidad del 60.9 % un valor aceptable.

En el presente estudio se observaron mejores resultados utilizando Triladyl® y el protocolo de centrifugación de 900 rxm durante 5 minutos con una viabilidad del

60.44 espermatozoides por cada 100 espermatozoides contados a diferencia del Ez-Freezin® con el mismo protocolo con una viabilidad del 44.44 espermatozoides por cada 100 contados, con lo que se puede considerar porcentajes de viabilidad de 60.44% y 44.44%, para Triladyl y EZ-Freezin, respectivamente.

La composición de la membrana plasmática del espermatozoide equino es muy sensible a cambios térmicos y químicamente la membrana plasmática está formada por una doble capa, compuesta fundamentalmente por lípidos (fosfolípidos y colesterol) en estudios realizados por Parks y Lynch en 1992, se comprobó que la membrana plasmática del espermatozoide equino contiene menor porcentaje de colesterol que la del bovino y el morueco (García, 2010). Por lo tanto esto le confiere menor tolerancia a los descensos de temperatura. Se asume una mejor interacción entre los componentes químicos de ambos diluyentes; encontrándose una mayor cantidad de crioprotectores en el Triladyl® (Cuadro 8) lo cual es beneficioso para la membrana plasmática del espermatozoide equino ya que los lípidos presentes en la yema de huevo estos se podrían adherir a la membrana plasmática del espermatozoide protegiéndolo mejor de esta forma de un shock térmico, explicando de esta manera los mejores parámetros de motilidad y viabilidad pos-descongelación en relación con el EZ-Freezin.

En el presente trabajo, el tiempo que transcurrió entre la colecta de semen y el congelamiento del semen en promedio fue de 3.15 horas, lo cual pudiera haber sido un factor para no obtener mayores valores de viabilidad, dicho tiempo difiere a lo que se recomienda por la literatura el cual no debiera pasar más de 20 minutos desde la recolección del semen hasta su congelación (Mckinnon, 1988). Es importante señalar que estos datos aún no son concluyentes para poder determinar al Triladyl como un diluyente para ser usado de manera rutinaria en la congelación de semen equino, es importante el poder hacer pruebas de fertilidad para poder hacer conclusiones definitivas acerca de su potencial.

Cuadro 10. Composición química de ambos diluyentes en proporción a 1 ml

Componente	Diluyente		Función
	Triladyl	Ez-Freezin	
	Cantidad		
Glicerol	0.04	0.23	Crioprotector
yema de huevo	0.20	0.17	Crioprotector
Fructuosa	1000	--	Fuente de energía
Lactosa	--	0.44	Fuente de energía
Glucosa	--	0.05	Fuente de energía
Acido cítrico	0.01		Buffer
Citrato de sodio	--	0.01	Buffer
Bicarbonato de sodio	--	0.00	Buffer
Tris	0.02		Amortiguador de pH
EDTA disódico		0.01	Amortiguador de pH
Tilosina	0.05	--	Inhibidor de crecimiento bacteriano
Gentamicina	0.25	--	Inhibidor de crecimiento bacteriano
Espectinomicina	0.30	--	Inhibidor de crecimiento bacteriano
Lincomicina	0.15	--	Inhibidor de crecimiento bacteriano
Ticarcilina disódica	--	0.01	Inhibidor de crecimiento bacteriano

El espermatozoide equino se centrifuga rutinariamente antes de la crioconservación para concentrarse y reducir al mínimo los efectos adversos del plasma seminal sobre la motilidad postdescongelación del semen (Pickett *et al.*, 1975). La totalidad del plasma seminal no es un medio adecuado para el proceso de la criopreservación del semen equino ya que este tiene efectos que repercuten o dañan al espermatozoide postdescongelación (Cochran *et al.*, 1984).

Sin embargo, la eliminación parcial del plasma seminal después de la centrifugación y la resuspensión del pellet espermático con un extender fue benéfico para la motilidad postdescongelación del semen criopreservado (Jasko *et al.*, 1991).

Por lo tanto, uno de los principales objetivos en el procesamiento de semen fresco equino refrigerado o congelado es reducir la cantidad de plasma seminal en el eyaculado esto se puede realizar con el proceso de la centrifugación (Len *et al.*, 2010).

7. Conclusiones

- El Triladyl® es un diluyente con propiedades químicas benéficas para la criopreservación del semen equino, al observar un promedio de 41.11 de espermatozoides con movilidad progresiva de cada 100 postdescongelación y un promedio 60.44 espermatozoides viables de cada 100; parámetros que están dentro de los rangos aceptables en la criopreservación del semen equino.
- El protocolo de centrifugación a 900 rpm durante 5 minutos observó mejores parámetros de movilidad y viabilidad lo cual puede ser empleado como un protocolo centrifugación con resultados aceptables.

8. Bibliografía

1. Allen, W.R. Bowen, J.H, Frank, C.J, Jeffcote, L.B. and Rossdale, PD. 1976. The current position of AI in horse breeding. *Equine veterinary journal* 8, 72-74.
2. Arruda R.P. 2000. Evaluación de los efectos de extensores y crioprotectores para espermatozoides equinos utilizando microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo analizando la motilidad computarizada (CASA) y morfometría (ASMA). Tesis de Doctorado en Reproducción Animal. Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia. Universidad de san Paulo. Pp. 120.
3. Aurich, J and Aurich, C. 2006. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reprod Domest Anim* 41:275-279.
4. Ávila, A. R. 2009. Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales. Tesis Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
5. Baker, C.A.V. y J.C.C Candier, 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canad. J. comp. Med.*21:47-51.
6. Blanchard, L, Varner, D, Schumacher, J, Love, C, Brinsko, P, Rigby, L. 2003. *Manual of equine reproduction*. (2 ed.) Mosby.
7. Boeta M, Zarco Q.L 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Veterinaria México* 31:67-69.

8. Brass K. 2001. Inseminación artificial en la especie equina. En Palma Gustavo (Eds) Biotecnología de la reproducción (pp. 525-561). Argentina: Instituto nacional de tecnologías agropecuarias.
9. Brinsko, S and Vanner, D.D. 1992. Artificial insemination and preservation of semen. Stallion management vet clinics North America: Equine practice. 205-218.
10. Carballo, G. D. 2005. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. XXI reunión científica-tecnológica forestal y agropecuaria Veracruz y del trópico mexicano
11. Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P. and Pickett, B.W. 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine spermatozoa. Theriogenology 22, 25-38.
12. Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial. Departamento de fisiología. Facultad de veterinaria de la universidad de Murcia.
13. García, M. 2010. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. Reprod Domest Anim, 2010.
14. Ginther, O.J. 1992. Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects, 2 nd. Equiservices Publishing, Cross plains, Wisconsin, USA, 642 pp.
15. Hafez E, Hafez B. 2000. En reproducción e inseminación artificial en animales. 7a edición. Mcgraw-hill.
16. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K and Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? J. Androl., 11(1), 73-88.
17. Heise A, Thompson P.N y Gerber D. 2011. Influencia del plasma seminal en parámetros frescos y después de la descongelación de espermatozoides del epidídimo seminal. Anim Sci Reprod. 2011, 123:192-201.

18. Hernández P.J.E, Fernández R.F, Rodríguez S.J.L, Soto M.Y.G y Verona J.E.H .2012. Viabilidad y Reacción acrosómica postcongelación en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de equino. Laboratorio Manejo de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, DF.
19. Hoogewijs, M., Rijsselaere T., Vliegheer., Vanhaesebrouck, E., Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van, A and Kruif, A. 2010. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74 (2010) 118-126.
20. Hughes, J.P and Loy, R.G. 1970. Artificial insemination in the equine: a comparison of natural breeding and AI of mares using semen from six stallions. *Cornell veterinarian* 60, 463-475.
21. Ijaz, A. and Ducharme, R. 1995. Effects of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 °C. *Theriogenology* 44 (7), 1039-1050.
22. Jasko D.J, Moran D.M, Farlin M.E, Squires E.L.1991. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* ;35:1059–67.
23. Jasko, D.J, Hathaway, J.A, Schaltenbrand, V.L, Simper, W.D and Squires, E.L. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241-1252.
24. Katila, T. 1997. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*.
25. Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L. and Morse, G.W .1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of 21 st Annual Convection of the American Association of equine practitioners*. American association of Equine practitioners, Lexington, Kentucky, pp. 327-335.

26. Krause D, Grove D. 1967. Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *J Reprod Fert* 14: 139-141
27. Lawson, K.A. and Davies Morel, M.C.G. 1996. The use of mare's milk as a seminal extender for chilled stallion semen. In: Warwick horse Conference February 1996 New developments in Equine Studies. Royal Agricultural Society, Kenilworth, UK, pp. 26-39.
28. Len, J.A, Jenkins, J.A, Eilts, B.E, Paccamonti, D.L, Lyle, S.K and Hosgood, G. 2010. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. Department of veterinary clinical sciences school of veterinary medicine, Louisiana State University. *Theriogenology* 73 225-231.
29. Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci*; 68:(3-4):191-200.
30. Loomis PR. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin N Am: Equine* 22: 663-676.
31. MacGann, L. 1978. Differing action of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*. 15 (1978):382-390.
32. Mazur P. 1984. Freezing of living cell. Mechanisms and applications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
33. McDonnell S. M. and Oristaglio R. M. 1994. Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine. *Theriogenology* 42:475-48.
34. McKinnon, A. O. Pickett, B. W. 1988. Equine reproductive ultrasonography; Colorado State University, U.S.A. (1988). Págs.21-31
35. Medeiros, A.; Gómez, G.; Carmo, M.; Papa, F. and Alvarenga, M. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 58. (2002):273-276.

36. Morel, D. 2005. Fisiología de la reproducción de los équidos, cría y manejo de la yeguada. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pp. 346.
37. Neira JA, Ramírez GF, León SA y Moreno DA. 2007. Efecto de la asociación L-glutamina- Etilenglicol en la criopreservación de semen equino. Revista de medicina veterinaria número 14. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia. Pp. 93-105.
38. Orozco, C.V, Rosemberg B.M, Santiani A. A y Rodríguez L.H. 2011. Evaluación de tres dilutores para la refrigeración de semen de caballo peruano de paso y sus efectos sobre la motilidad espermática e integridad funcional de la membrana. Universidad Científica del Sur. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia. Unidad de Zootécnica y Tecnológica. Lima.
39. Palacios, A.A y Zarco, L.1992. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albumina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelación del espermatozoide equino.
40. Papa FO, Melo CM, Dell'aqua JA, Macedo LP, Carvalho AG, Alvarenga MA, Medeiros ASL. 2005. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. Acta SciVet 33(Suppl.1): 19-27.
41. Parks J.E y Lynch D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology 29, 255-266.
42. Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, pace MM, Remmenga EE. 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil Steril 1975;26: 167-74.
43. Pineda, G. S y Pinilla, A.S.M. 2007. Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en la preservación

- de semen equino. universidad de la salle facultad de medicina veterinaria. bogotá d.c 2007
44. Province, C.A, Amann, R.P, Pickett, B.W and Squires, E.L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22, 409-415.
45. Quijano, G. 2013. aspectos regulatorios, vinculados a la operación de un Ceprosem para equinos. *Reproducción Equina Villaraña*. Comité equinos conasa.
46. Salomon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.
47. Samper J.C. 2007. Reproductive system: evaluation of the breeding stallion. *Anais: Fórum Internacional de Medicina Equina- ABRAVEQ, São Paulo*. 18 p.
48. Samper JC and Hankins K. 2001. Breeding mares with frozen semen in private practice. *American Association of Equine Practitioners* 47, 314-318.
49. Samper JC y Morris CA. 1998. Los métodos actuales para la crioconservación de semen semental: una encuesta. *Theriogenology*. 49:895-903.
50. Sánchez RA, Cartagena PA y Berland OM. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 17:1-7
51. Schulman ML, Gerber D, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzold R, et al. Los efectos de la anestesia con halotano sobre la criopreservación de espermatozoides del epidídimo en sementales pony. *Equine Vet J*. 2003; 35 (1) :93-95.
52. Serres C y Álvarez A.L. 2006. Inseminación artificial en la especie equina. Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

53. Squires, E.L, McGlothlin, D.E, Bowen, R.A, Berndtson, W.E and Pickett, B.W. 1981. The use of antibiotics in stallion semen for the control of *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*. Equine veterinary science 1, 43-48.
54. Szasz F, Gabor G y Solti L. 2000. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. Acta Veterinaria Hungarica. 48:325-333.
55. Varner, D.D. 1991 Composition of seminal extenders and its effect on mobility of equine spermatozoa. Proceedings of the Annual Meeting of the society for Theriogenology 1991, 146-150.
56. Weiss S, Janett F, Burger D, Haßsig M, Thun R. 2004. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. Schweiz Arch Tierheilk 2004;146:285-93.
57. Whittingham, D. 1971. Culture of mouse ova. Reproduction et fertilité. 14. (1971):7-21.
58. Wilde O.R., De la Vega A.C y Parra R.W. 1990. Respuesta del semen descongelado en diluyentes cafeínados. Revista Agron. N. O. Argent., 25(1-4): 65-83.
59. www.minitube.com. Consulta en línea. 15-10-12.