

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Cirugía y Medicina Animal



**EVALUACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN EN EL
ASNO ZAMORANO-LEONES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Consuelo Serres Dalmau

Bajo la dirección del Doctor:

Eugenio Mateos Rex
Concepción Gómez-Cuétara Aguilar

Madrid, 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

EVALUACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN EN EL ASNO ZAMORANO-LEONÉS

Memoria presentada por la licenciada
Consuelo Serres Dalmau
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria
Madrid, 2003

Dirigida por D. Eugenio Mateos Rex
D^a. Concepción Gómez-Cuétara Aguilar

Departamento
Cirugía y Medicina Animal
Madrid

Concepción Gómez-Cuétara Aguilar, Doctora en Veterinaria y Profesor Asociado del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Eugenio Mateos Rex, doctor en Veterinaria y Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **EVALUACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN DE BURRO ZAMORANO-LEONÉS**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. **Consuelo Serres Dalmau**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple las condiciones exigidas para ser presentada a efectos de ser juzgada.

Y para que así conste firmamos el presente informe en Madrid a diecisiete de Diciembre del año dos mil tres.

Fdo. D^a Concepción Gómez-Cuétara Aguilar Fdo. D. Eugenio Mateos Rex

A Inés, Víctor y mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la desinteresada colaboración de muchos compañeros, pero también gracias al apoyo físico y moral de mi familia.

En primer lugar gracias a mi hija Inés, por estar conmigo desde el principio aún cuando casi no existía, a Víctor por su ayuda moral; gracias a los dos por soportarme en los momentos bajos.

A mi madre, gracias por cuidar y criar Inés como su propia hija y por quitarme preocupaciones. Gracias al resto de mi familia, mi padre y mis hermanos por colaborar durante este tiempo en todo lo que he necesitado.

Por supuesto a mis compañeras Ana, Arancha e Isabel, porque sin ellas no hubiese podido llevar a cabo este estudio.

A todos los alumnos internos, a los residentes, a Marcelo y a los demás compañeros de Laboratorio, por hacerme más agradable mi trabajo.

A mis directores, a Eugenio por aportar su experiencia y el buen gusto literario que le caracteriza y a Concha por ser mi amiga, por incorporarme al mundo de los caballos e introducirme en la investigación, por conseguir el apoyo económico necesario para la realización de este estudio y por dedicarme gran parte de su tiempo, pero sobre todo por dejarme ser la "primera".

A la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa que ha sufragado los gastos de este trabajo y en particular a Jesús de Gabriel, su presidente, que además prestó sus burros para la toma de muestras.

A Cría Caballar por la cesión de sus garañones.

A Antonio Izquierdo, por Pícaro y por todos estos años de amistad.

A los directores del Departamento ahora llamado Medicina y Cirugía Animal y del Hospital Clínico, María Castaño, Juana María Flores, Fidel San Román y Alfonso Rodríguez por el uso de las instalaciones, del material utilizado y en especial por su apoyo y consejo.

Gracias al personal del Centro de Citometría de Flujo.

A Pedro Cuesta por la aportación de sus conocimientos estadísticos.

A los Garañones “Jicho, Gerineldo, Pícaro, Otsu, Iglo, Mozo y Puertollano” verdaderos protagonistas de esta aventura.

Mencionar finalmente que este trabajo ha sido financiado por el Artículo 11 “Estudio de los parámetros reproductivos del burro zamorano-leonés y realización del banco de germoplasma”.



ÍNDICE

ÍNDICE.....	..I
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	..VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	..VIII
ÍNDICE DE FOTOS.....	..IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	..X
ÍNDICE DE TABLAS.....	..XII
1. INTRODUCCIÓN.....	..1
<u>1.1 Objetivos</u>6
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	..7
<u>2.1. Características y situación del asno zamorano-leonés</u>7
2.1.1 Patrón racial.....	..8
2.1.2 Carácter.....	..11
<u>2.2. Características reproductivas del equus asinus</u>11
2.2.1. Comportamiento sexual.....	..12
<u>2.3. Características del semen</u>13
<u>2.4. Sistemas de evaluación del semen</u>18
2.4.1. Sistemas de recogida de semen.....	..20
<u>2.4.1.1. Vagina artificial</u>20
2.4.2. Evaluación de la producción seminal.....	..21
<u>2.4.2.1. Producción y obtención diaria de espermatozoides</u>22

2.4.3. Evaluación de la calidad del semen	23
<u>2.4.3.1. Número de espermatozoides de un eyaculado</u>	23
<u>2.4.3.2. Pruebas de motilidad</u>	24
<u>2.4.3.3. Longevidad de la motilidad</u>	28
<u>2.4.3.4. Morfoanomalías</u>	28
<u>2.4.3.5. Evaluación de la membrana plasmática de la cabeza</u>	30
<u>2.4.3.6. Evaluación de la membrana acrosomal</u>	30
<u>2.4.3.7. Evaluación de la membrana plasmática del flagelo</u>	31
<u>2.4.3.8. Otras pruebas</u>	32
2.4.4. Factores que afectan a la producción y calidad del semen equino	33
<u>2.4.4.1. Efecto de la estacionalidad</u>	33
<u>2.4.4.2. Tamaño testicular</u>	34
<u>2.4.4.3. Efecto de la edad</u>	34
<u>2.4.4.4. Frecuencia de eyaculación</u>	35
<u>2.4.4.5. Otros factores</u>	36
2.4.5. Producción y calidad de semen y su relación con la fertilidad	36
<u>2.5. Sistemas de conservación del semen</u>	42
2.5.1. Refrigeración del semen	42
<u>2.5.1.1. Procesamiento del semen refrigerado</u>	43
2.5.1.1.1. Efecto del plasma seminal.....	46
2.5.1.1.2. Efecto del diluyente.....	48
2.5.1.1.4. Efecto de la dilución.....	49
2.5.1.1.3. Efecto de la temperatura.....	49
2.5.1.1.5. Efecto del tiempo de conservación.....	51
<u>2.5.1.2. Fertilidad del semen refrigerado</u>	52

2.5.2. Congelación de semen52
<u>2.5.2.1. Criobiología espermática</u>53
2.5.2.1.1. Congelación.....	.54
2.5.2.1.2. Descongelación.....	.55
2.5.2.1.3. Crioprotectores.....	.55
<u>2.5.2.2. Procesado del semen</u>58
2.5.2.2.1. Dilución y centrifugación.....	.59
2.5.2.2.2. Diluyente de congelación.....	.60
2.5.2.2.3. Refrigeración y equilibración.....	.62
2.5.2.2.4. Envasado.....	.63
2.5.2.2.5. Congelación y almacenamiento.....	.65
2.5.2.3.6. Descongelación del semen.....	.65
<u>2.3.2.5. Fertilidad del semen congelado</u>67
3. MATERIAL Y MÉTODOS70
<u>3.1. Diseño experimental</u>70
3.1.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa70
3.1.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa.....	.71
3.1.3. Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa.....	.74

<u>3.2 Animales</u>76
<u>3.3 Medios y soluciones</u>76
3.3.1. Medios para el análisis de integridad de la membrana plasmática.	.77
3.3.2. Medios para la refrigeración del semen.....	.78
3.3.3 Medios de congelación.....	.80
3.3.4. Medios para la citometría de flujo.....	.81
<u>3.4 Recolección de semen</u>82
3.4.1. Recolección de semen con vagina cerrada.....	.82
3.4.2. Recolección de semen con vagina abierta.....	.82
<u>3.5 Contrastación seminal</u>83
3.5.1. Volumen (Vo).....	.83
3.5.2. Concentración (C).....	.83
3.5.3. PH (pH).....	.83
3.5.4. Número total de espermatozoides por eyaculado (NT).....	.83
3.5.5. Estimación subjetiva de la motilidad espermática.....	.83
3.5.6. Porcentaje de espermatozoides con morfología normal (N).....	.84
3.5.7. Porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática (HOS).....	.85
3.5.8. Número de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado (NTMP).....	.86
3.5.9. Número de espermatozoides con motilidad progresiva y morfología normal por eyaculado (NTMPN).....	.86

3.5.10. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (A).....	.86
3.5.11. Análisis computerizado de la motilidad (CASA).....	.87
3.5.12. Evaluación de la vitalidad e integridad de la membrana acrosomal mediante citometría de flujo (CF).....	.88
<u>3.6. Procesado del semen</u>89
3.6.1. Centrifugación del semen.....	.89
3.6.2. Refrigeración del semen.....	.89
3.6.3. Congelación del semen.....	.89
3.6.4. Descongelación.....	.90
<u>3.7. Análisis estadístico</u>90
4. RESULTADOS91
<u>4.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa</u>91
<u>4.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa</u>95
4.2.1.- Evaluación del tiempo de conservación de la motilidad progresiva.....	.96
4.2.2. Evaluación de la calidad seminal en las primeras 48 horas de conservación.....	100

<u>4.3 Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa</u>	107
4.3.1. Evaluación de las muestras tras la descongelación.....	107
4.3.2. Evaluación de las muestras después de una hora de incubación a 37°C.....	111
5. DISCUSIÓN	115
<u>5.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa</u>	115
<u>5.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa</u>	119
<u>5.3 Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa</u>	123
6. CONCLUSIONES	130
7. RESUMEN	132
<u>7.1. Summary</u>	134
8. BIBLIOGRAFÍA	136

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 3-1: Eyaculados recogidos con vagina cerrada.....	.72
Esquema 3-2: Eyaculados recogidos con vagina abierta.....	.73
Esquema 3-3: Congelación del semen.....	.75

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 2-1: Morfología del espermatozoide..... 14

Fig. 2-2: Regiones o compartimentos del espermatozoide equino y sus correspondientes métodos de evaluación..... 19

Fig. 2-3: Representación esquemática de diferentes parámetros evaluados por un sistema computerizado de análisis de semen.....
.27

Fig. 2-4: Relación entre fertilidad y características seminales..... 38

Fig. 2-5: Estructura de la membrana celular según el “modelo de mosaico fluido”..... 44

Fig. 2-6: Estructura de la membrana celular del espermatozoide, alteraciones inducidas por el choque frío..... 45

Fig 3-1: Morfoanomalías espermáticas..... 84

Fig. 3-2: Test hiposmótico..... 85

Fig. 3-3: Representación de la tinción espermática con PI-FITC-PSA..... 88

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 3-1: Test hiposmótico..... .85

Foto 3-2: Tinción de Spermac..... .86

Foto 3-3: Imagen obtenida con el sistema CASA..... .87

Foto 3-4: Imagen obtenida con citometría de flujo..... .88

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 4.2-1: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación.....	.96
Gráfica 4.2-2: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación.....	.96
Gráfica 4.2-3: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.....	.97
Gráfica 4.2-4: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.....	.97
Gráfica 4.2-5: Efecto de la temperatura en el tiempo de conservación.....	.98
Gráfica 4.2-6: Tiempo de conservación del semen.....	.99
Gráfica 4.2-7: Motilidad total a 12 h.....	101
Gráfica 4.2-8: Motilidad progresiva a 12 h.....	101
Gráfica 4.2-9: Test hiposmótico a 12 h.....	101
Gráfica 4.2-10: Motilidad total a 24 h.....	102
Gráfica 4.2-11: Motilidad progresiva a 24 h.....	102
Gráfica 4.2-12: Test hiposmótico a 24 h.....	102
Gráfica 4.2-13: Motilidad total a 36 h.....	103
Gráfica 4.2-14: Motilidad progresiva a 36 h.....	103
Gráfica 4.2-15: Test hiposmótico a 36 h.....	103
Gráfica 4.2-16: Motilidad total a 48 h.....	104
Gráfica 4.2-17: Motilidad progresiva a 48 h.....	104
Gráfica 4.2-18: Test hiposmótico a 48 h.....	104
Gráfica 4.2-19: Porcentaje de MT a lo largo del tiempo.....	105
Gráfica 4.2-20: Porcentaje de MP a lo largo del tiempo.....	105

Gráfica 4.2-21: Porcentaje de HOS a lo largo del tiempo.....	105
Gráfica 4.2-22: % HOS a lo largo del tiempo (AA x I).....	106
Gráfica 4.2-23: % HOS a lo largo del tiempo (CC x I).....	106
Gráfica 4.2-24: % HOS a lo largo del tiempo (CC x K).....	106
Gráfica 4.3-1: % de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) del semen descongelado.....	107
Gráfica 4.3-2: Características de la motilidad del semen descongelado: VCL, VSL, VAP.....	108
Gráfica 4.3-3: Características de la motilidad del semen descongelado: LIN, STR.....	108
Gráfica 4.3-4: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado.....	109
Gráfica 4.3-5: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado.....	110
Gráfica 4.3-6: % de motilidad total (MT 1h) y motilidad progresiva (MP 1h) del semen descongelado incubado 1 hora.....	111
Gráfica 4.3-7: Características de la motilidad del semen descongelado después de una hora de incubación: VCL 1h, VSL 1h, VAP 1h.....	112
Gráfica 4.3-8: Características de la motilidad del semen descongelado después de una hora de incubación: LIN 1h, STR 1h.....	112
Gráfica 4.3-9: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado después de una hora de incubación.....	113
Gráfica 4.3-10: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado incubado 1 hora.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Parámetros seleccionados en algunos estudios de semen según la especie..... .25

Tabla 2-2: Parámetros utilizados en el análisis de la motilidad en semen de asno mediante un sistema computerizado26

Tabla 2-3: Características de la motilidad del semen de burro..... .27

Tabla 2-4: Efecto de la edad en la concentración espermática del semen de asno..... .35

Tabla 2-5: Coeficientes de correlación entre las características cinéticas del semen y la fertilidad en el caballo..... .39

Tabla 2-6: Comparación de la motilidad, VCL, ALH y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y ondulante de eyaculados que engendraron o no gestaciones..... .40

Tabla 2-7: Diluyente T2-94..... .62

Tabla 2-8: Diferentes protocolos de descongelación de semen de caballo según tipo de envasado..... .66

Tabla 2-9: Fertilidad del semen congelado-descongelado del semen de burro del Poitou..... .68

Tabla 3-1: Solución HOS..... .77

Tabla 3-2: Formol-citrato..... .77

Tabla 3-3: Leche descremada..... .78

Tabla 3-4: Kenney..... .78

Tabla 3-5: INRA 82..... .79

Tabla 3-6: TRIS-yema..... .79

Tabla 3-7: BURNS..... .80

Tabla 3-8: SMEY.....	.80
Tabla 3-9: PBS.....	.81
Tabla 3-10: PI.....	.81
Tabla 3-11: PSA.....	.81
Tabla 3-12: Variables utilizadas para el análisis computerizado de la motilidad.....	.87
Tabla 4.1-1: Valores promedio del análisis seminal del burro de raza Zamorano-Leonesa.....	.91
Tabla 4.1-2: Valores promedio por individuo del análisis seminal del burro de raza Zamorano-Leonesa.....	.92
Tabla 4.1-3: Morfoanomalías de los espermatozoides de burro de raza Zamorano-leonesa....	.93
Tabla 4.1-4: Valores promedio por individuo de las morfoanomalías espermáticas.....	.94
Tabla 4.2-1: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación....	.96
Tabla 4.2-2: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación según la temperatura.....	.96
Tabla 4.2-3: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.....	.97
Tabla 4.2-4: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación según la temperatura.....	.97
Tabla 4.2-5: Efecto de la temperatura en el tiempo de conservación.....	.98
Tabla 4.2-6: Tiempo de conservación del semen.....	.99
Tabla 4.2-7: Siete mejores tratamientos.....	100
Tabla 4.2-8: Calidad del semen a las 12 horas.....	101
Tabla 4.2-9: Calidad del semen a las 24 horas.....	102
Tabla 4.2-10: Calidad del semen a las 36 horas.....	103
Tabla 4.2-11: Calidad del semen a las 48 horas.....	104

Tabla 4.3-1: % de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) del semen descongelado	107
Tabla 4.3-2: Características de la motilidad del semen descongelado.....	108
Tabla 4.3-3: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado....	109
Tabla 4.3-4: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado.....	110
Tabla 4.3-5: % de motilidad total (MT 1h) y motilidad progresiva (MP 1h) del semen descongelado incubado 1 hora.....	111
Tabla 4.3-6: Características de la motilidad del semen descongelado después de una hora de incubación.....	112
Tabla 4.3-7: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado después de una hora de incubación.....	113
Tabla 4.3-8: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado incubado 1 hora.....	114



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Según el último Censo General Ganadero, que data de Marzo de 1986, la población asnal española era de 140.000 ejemplares, lo que supone un descenso del 80% con relación a la cabaña existente en 1960. La reducción de la población de 1980 a 1986 fue de un 5% anual por lo que es muy posible que en la actualidad el número total de ejemplares no supere los 60.000. Actualmente existen en España seis razas asnales algunas de las cuales como la Mallorquina están prácticamente extinguidas ya que de acuerdo con los datos de Svendsen (1997) sólo quedan 12 garañones y 60 hembras.

La raza asnal Zamorano-Leonesa proviene del *Equus asinus* europeo; es una población autóctona de la comunidad de Castilla y León con unas características de rusticidad y adaptación únicas que permitieron su expansión por todo el centro y el oeste peninsular. Intervino, además, en la formación de algunas razas extranjeras como el asno de Poitou y el asno Americano. Por otra parte sus garañones fueron muy utilizados en la producción mular tanto en España como en el extranjero. Desde la mecanización del campo su población ha decaído de tal manera que en la actualidad, según Rodero (1998), viven menos de 1000 individuos al oeste de la provincia de Zamora, de los cuales 200 hembras y 20 machos están considerados de alto valor genético.

En 1940 la Dirección General de Ganadería implantó el libro genealógico de la raza Zamorano-Leonesa que en la práctica desapareció a finales de los años sesenta debido tanto a la falta de interés oficial como a la drástica disminución del número de ejemplares. En 1980 el Ministerio de Agricultura declara a la raza de "protección oficial" pasando finalmente a la categoría de "en peligro de extinción" según el vigente Catálogo de Razas de Ganado en España. La conservación y mejora del patrimonio genético que representa es por tanto de interés prioritario. La Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa (ASZAL) está haciendo grandes esfuerzos para estimular el uso y desarrollo de esta raza con el fin asegurar el mantenimiento del tesoro genético que esto supone para futuras generaciones.

Las especies equinas en general poseen una baja eficiencia reproductiva; de hecho se considera como normal un índice de partos del 50 – 60%, si bien en yegadas con buen manejo y control intensivo de la reproducción se alcanzan índices de partos del 80%. El comportamiento reproductivo de la raza asnal Zamorano-Leonesa es todavía peor, los últimos datos ofrecidos por ASZAL (Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa) son decepcionantes, de un censo de 1000 animales se han registrado 80 nacimientos. Estos datos nos hacen pensar que no sólo el desconocimiento de la fisiología reproductiva de esta especie, sino también una serie de factores entre los que podemos destacar el hecho de que la mayoría de las hembras registradas son viejas o viven en núcleos aislados, el deficiente manejo reproductivo de los garañones y la selección de los mismos sin tener en cuenta su calidad reproductiva, son responsables de este bajísimo rendimiento reproductivo.

Conscientes de este hecho propusimos a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa el desarrollo de un estudio sobre los parámetros reproductivos del macho como primer paso para el desarrollo de un sistema de congelación de semen que nos permitiera en el futuro crear un banco genético. Esta propuesta se plasmó con la firma en Diciembre del año 2000 de un *Artículo 11* entre dicha asociación y nuestro equipo investigador gracias al cual hemos dispuesto de 7 garañones de la raza en los que, tras su entrenamiento para poder recoger el semen mediante vagina artificial, hemos estudiado las características del semen en esta raza tanto en lo concerniente a la producción como a la calidad.

La biotecnología reproductiva (inseminación artificial, congelación de gametos, transferencia de embriones, etc....) es un arma poderosa para la conservación del patrimonio genético (Holt, 1999), desgraciadamente la bibliografía existente sobre la reproducción del asno es muy antigua y escasa y prácticamente nula en el caso de la raza Zamorano-Leonesa. En la práctica se extrapolan los parámetros reproductivos de la yegua a la burra y del semental al garañón y sin embargo existen pruebas que demuestran las diferencias existentes entre ambas especies. Los estudios publicados recientemente están centrados en las características reproductivas de varias razas de burros en peligro de extinción pero son aún insuficientes;

además es posible prever que se van a encontrar diferencias entre razas, sobre todo porque se desarrollan bajo condiciones medioambientales totalmente diferentes.

La refrigeración y conservación a corto plazo del semen puede ser un medio muy importante para la difusión de material genético entre poblaciones escasas y aisladas, ya que asegura un lapso de tiempo suficiente para el traslado de los gametos (espermatozoides) hasta el lugar en que se encuentra la hembra con un bajo costo, permitiendo el mayor y mejor empleo de los sementales de mayor valor genético. La congelación de semen y la inseminación artificial adquieren una importancia especial ya que nos permiten conservar indefinidamente material genético de razas en peligro de extinción. En España existen varias razas de asnos, de ellas el asno zamorano-leonés es una de las más importantes y la aplicación de las modernas técnicas de reproducción deben permitir salvaguardar este tesoro genético para las generaciones futuras.

El semen refrigerado en el caballo se lleva usando desde hace muchos años para la inseminación de yeguas con resultados muy satisfactorios y se han desarrollado diferentes metodologías para la conservación del semen equino refrigerado comenzando por la eliminación o no del plasma seminal, posterior dilución y la temperatura de conservación. Sin embargo en la especie asnal sólo algunos artículos han evaluado ciertos factores que afectan a la viabilidad del semen de burro refrigerado.

Nosotros comprobaremos si la supresión del plasma seminal, al igual que ocurre en caballos, permite alargar la vida de los espermatozoides, y si esta eliminación del plasma seminal es más efectiva mediante la colección con vagina cerrada del eyaculado completo y posterior eliminación del plasma seminal mediante centrifugación o la colección únicamente de la fracción del eyaculado rica en espermatozoides mediante vagina abierta, lo que permitiría evitar la centrifugación del semen ya que ésta puede dañar físicamente a las células.

La dilución del semen permite aportar nutrientes y sustancias protectoras que alargan la vida del espermatozoide; en caballos se han desarrollado diferentes medios que aportan minerales, azúcares y lípidos y cuya eficacia pretendemos evaluar frente al semen de asno. Un componente muy importante de los diluyentes son los fosfolípidos contenidos en la leche desnatada que actúan como crioprotectores estabilizando las membranas celulares; la leche desnatada ha sido utilizada, por separado o mezclada en distintas proporciones con azúcares y minerales, en la refrigeración de semen de équidos. Nuestra intención es contrastar la eficacia de algunos diluyentes utilizados en el ganado equino para la refrigeración del semen de burro.

Por último, la temperatura más utilizada en la refrigeración del semen equino es la de 4°C, esta bajada de temperatura produce cambios en la estructura de la membrana espermática que provocan una mayor labilidad. Para Batellier y col. (1998) la conservación de semen equino a 15°C podría disminuir este daño celular; en este estudio compararemos el efecto de la conservación del semen de burro a estas dos temperaturas.

La congelación de semen permite el almacenamiento indefinido de material genético y la creación de bancos genéticos que posteriormente pueden ser empleados dentro de planes de recuperación de razas en peligro de extinción facilitando la multiplicación del número de ejemplares y disminuyendo los niveles de consanguinidad. Prácticamente no existe bibliografía sobre congelación de semen e inseminación artificial con semen congelado en burros excepto los artículos publicados por Trimeche y col. en los que describen un método para la congelación del semen de burros de Poitou con el que obtuvieron el nacimiento de varios buches vivos. En el artículo publicado por Trimeche y col. en 1998 sólo se obtuvieron gestaciones tras la inseminación cuando disminuían la concentración de glicerol mediante la dilución del semen tras la descongelación. Dado que en el estudio de Trimeche y col. el glicerol no era eliminado totalmente sino diluido tras la descongelación pretendemos determinar si este efecto del glicerol puede ser obviado mediante la utilización de concentraciones menores.

Recientemente Alvarenga y col., (2000^{ab}) han utilizado en caballo crioprotectores alternativos al glicerol, entre ellos el etilenglicol, que presenta propiedades crioprotectoras semejantes al glicerol siendo menos tóxico, por lo que pretendemos también evaluar el empleo del etilenglicol como crioprotector en la especie asnal. Para ello compararemos dos diluyentes utilizados rutinariamente en la especie equina, a los que adicionamos glicerol o etilenglicol en distintas proporciones.

Mediante este proyecto hemos iniciado una línea de trabajo sobre la reproducción en el asno zamorano-leonés que nos permitirá un mejor y más racional uso de los escasos recursos genéticos con que contamos en esta raza.

1.1 Objetivos

1. Determinar los parámetros normales del semen del burro zamorano-leonés.

2. Optimizar la metodología de refrigeración de semen en esta raza estudiando
 - 2.1 El efecto del plasma seminal y de su técnica de eliminación
 - 2.2 El efecto del diluyente
 - 2.3 El efecto de la temperatura de conservación

3. Desarrollo de un sistema de crioconservación del semen en esta raza estudiando
 - 3.1 El efecto del diluyente
 - 3.2 El efecto del crioprotector y su concentración



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características y situación del asno zamorano-leonés

El asno zamorano-leonés es un asno procedente del *Equus asinus* europeo, antiguamente era dominante en la zona geográfica delimitada por la Cordillera Cantábrica y Picos de Europa y los ríos Cea y Orbigo, extendiéndose por las dos Castillas; intervino, además, en la formación de algunas razas extranjeras como el asno de Poitou y el asno Americano y sus garañones fueron muy utilizados en la producción mular tanto en España como en el extranjero. En la actualidad sólo quedan animales en la provincia de Zamora y norte de Salamanca, en las comarcas de Sanabria, Carballeda, Aliste, Alba, Tierra de Pan y Sayago y los mejores ejemplares están en el triángulo formado por San Vitero, Pina y Almaráz. Es un asno bien conformado y de gran corpulencia; se caracteriza por el color oscuro de su capa (negra mal teñida o sucia), voluminosa cabeza, perfil recto, las órbitas de los ojos muy marcadas y abundante pelaje en frente, ojos, contorno de las orejas y la parte inferior del vientre. El patrón racial queda definido a finales de 1998 en el Libro Genealógico de la raza por Orden de 30 de octubre de 1998 (B.O.C. y L. de 23 de noviembre).

Desde la mecanización del campo su población ha decaído de tal manera que, según Rodero y col. (1998), en la actualidad viven menos de 1000 individuos al oeste de la provincia de Zamora. Los problemas de la extinción de esta raza van asociados a los problemas socioeconómicos de la población humana agraria: envejecimiento, reducción de la población activa, emigración; así el 95 % de los ejemplares se hallan en manos de agricultores jubilados. Además es una raza con una eficiencia reproductiva baja, consecuencia tanto del deficiente manejo reproductivo de los garañones como del hecho de que la mayoría de las hembras registradas son viejas o viven en núcleos aislados.

El libro genealógico se implantó en los años 40 desapareciendo en la práctica en los años sesenta. En 1980 el Ministerio de Agricultura declara a la raza de "protección oficial" pasando en 1997 y hasta la actualidad a la categoría de "en peligro de extinción" según el

Catálogo de Razas Autóctonas de Animales Domésticos (R.D 1682/1997; Anuario Estadístico Agrario 1997, MAPA). La conservación y mejora del patrimonio genético que representa es por tanto de interés prioritario. En 1995 se creó la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa (ASZAL) que está haciendo grandes esfuerzos en estimular el uso y desarrollo de esta raza para asegurar el mantenimiento del tesoro genético que ésto supone para futuras generaciones.

En la actualidad el censo cuenta con unas 1000 hembras de las cuales sólo 100 se dedican a la reproducción, sobreviviendo en estos últimos años unas 50 crías anuales. Los núcleos más importantes de asno zamorano-leonés que hoy existen son:

- Écija (Sevilla) Finca las Turquillas propiedad de la Subdelegación de Cría Caballar.
- Diputación provincial de Zamora: Granja la Aldehuela.
- CENSYRA de León.
- Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Asnal Zamorano-Leonesa (ASZAL) que tiene en Zamora cedidos seis garañones propiedad de Cría Caballar.
- Jesús de Gabriel Pérez en Villardondiego, Zamora.

2.1.1. Patrón racial

El patrón racial queda definido a finales de 1998 en el Libro Genealógico de la raza por Orden de 30 de octubre de 1998 (B.O.C. y L. de 23 de noviembre).

“En general se trata de un asno bien conformado, con manifiesta acromegalia; de gran corpulencia, cabeza muy voluminosa con pabellones auriculares anchos y agrandados, recio esqueleto por el que destacan sus extremidades y buen temperamento; de hirsutismo

acentuado, con pelo largo, basto y abundante; de buena talla y con gran dimorfismo sexual. Es un animal subcóncavo, hipermétrico y sublongilíneo.

Cabeza.- Grande, larga, ancha entre las órbitas, de perfil generalmente subcóncavo con tendencia a rectilíneo, encontrándose ejemplares que presentan una ligera depresión a nivel fronto-nasal con elevación de los supranasales, dando lugar a la insinuación de la típica cabeza de rinoceronte. Más pequeña en las hembras y de perfil más recto. Frente ligeramente deprimida y ancha, cuencas poco hundidas, arcadas orbitarias salientes, lagrimal muy alargado y ojos hundidos cubiertos por abundante pelo en los ejemplares jóvenes y en las hembras. La cara es alargada y ancha. La nuca amplia, de abundante tupé, y orejas grandes y anchas en uve, inclinadas hacia el frente o hacia los lados, dotadas en sus bordes de abundantes pelos en jirones. Hocico con ollares bien desarrollados, amplios y rasgados, formando con los supranasales un ángulo de gran abertura -chaflán característico-, que poseen bastante movilidad, recubiertos de fino pelo; labios gruesos, carnosos y unidos en ángulo recto; el barboquejo es elevado. Potente maxilar inferior con buena separación de las ramas, dando lugar a un canal posterior amplio.

Cuello.- En apariencia corto, recto, musculoso, con tendencia a la horizontalidad, poco elevado, aunque en ocasiones si las masas musculares no son muy potentes es cóncavo o de ciervo; con gotera de la yugular bien marcada en animales esquilados, tablas ligeramente convexas y crines caídas hacia uno de los lados; cuello más fino y menos musculado en la hembra. En los machos la papada es corta y algo oblicua, más horizontal en las hembras.

Tronco.- Moderadamente corto, con cruz baja, poco destacada, seguido de una línea dorsal un poco cóncava, llegando a veces al ensillado, y de una grupa elevada, oblicua y ojival o almendrada, sobre todo en las hembras, ancha entre los ángulos externos de los iliones estrechándose hacia atrás; cola gruesa en el arranque que afina enseguida, corta y de nacimiento bajo entre isquiones, provista de largas cerdas. La altura de la grupa en su porción más elevada suele estar a igual altura que la cruz; lomos cortos, anchos, firmes y musculados. Pecho alto, ancho, profundo, con esternón saliente y gran desarrollo de la quilla en la parte

anterior; con la cavidad torácica amplia y costillares que tienden a ser planos. Vientre voluminoso, descendido más en la hembra y cubierto por una producción epidérmica abundante que pende en forma de jirones. Organos genitales bien desarrollados en ambos sexos.

Extremidades.- Gruesas, provistas de tendones fuertes y poco unidos a la caña; pobladas de abundante pelo, dando al conjunto una franca impresión de fortaleza. En las anteriores con espalda un poco inclinada y corta -más horizontal en la hembra-, con el encuentro bien marcado, dando gran realce al animal. Brazo no demasiado fuerte -más débil en la hembra-, pero con codo desarrollado, rodillas amplias, de gran base y perímetro. Cañas anchas y cortas y también de notable fortaleza -más finas en la hembra-, de tendones gruesos, fuertes y poco pegados; menudillos robustos, rectos e inclinados hacia dentro; cuartillas cortas y bien dirigidas. En las extremidades posteriores se nota poco desarrollo muscular; anca estrecha, nalga larga, ancha y poco abultada, con el muslo de borde posterior rectilíneo y en muchos casos cóncavo, pierna con igual formación, sobre todo en la hembra; corvejones anchos, largos, bien constituidos y metatarsianos como sus homólogos de los miembros anteriores; posee grandes espejuelos. Cascos relativamente anchos en un gran número de ejemplares y bien desarrollados, con tapas espesas en las extremidades anteriores. Los aplomos en las extremidades anteriores suelen ser buenos, pero con frecuencia izquierdos.

Capa.- La predominante es la negra mal teñida o sucia, tirando a parda en los individuos más viejos, aunque también en los buches y adultos se puede observar una tonalidad más rubia; esta copa se degrada hasta convertirse en plateada en las cercanías de la nariz, desde casi la mitad de la cara hasta un par de dedos por detrás de las comisuras de los labios, alrededor de los ojos, axilas, interaxilas, parte inferior del pecho y cara interna de las nalgas, bragadas y bajo vientre, siendo la unión de ambos colores insensible. El desarrollo capilar es más o menos acentuado según las regiones corporales, pero siempre es grande, lo que le da al animal una especial fisonomía; es largo, abundante y basto en las regiones de las orejas, ojos, espacio intermaxilar, dorso, planos costales, vientre y extremidades -que desde el menudillo y corona caen sobre el casco-, colgándole pelos largos en desiguales jirones o flecos, graciosamente rizados, pudiendo alcanzar longitudes de 25 a 30 centímetros. Se admiten ejemplares de pelo

más fino o corto, siempre que los demás caracteres raciales y principalmente la presencia de pelo en la región auricular esté bien acusada.

Aspecto de conjunto.- Rectilíneo, subhipermétrico, mediolíneo. Defectos leves de conformación general. Medianamente corpulento. Esqueleto no muy marcado.

Defectos graves.- En general, defectos leves muy acusados. Cabeza acarnerada, frente abombada. Cuello de gato. Grupa excesivamente derribada y estrecha en ambos sexos. Vientre de galgo. Extremidades muy finas. Machos monórquidos o criptórquidos. Presencia de raya de mulo o banda crucial. Graves defectos de aplomos. Cualquier otra capa diferente a la descrita en el prototipo racial. Ausencia total de lana. Mala conformación anatómica, debilidad general, escasa talla o brevilíneo”.

2.1.2 Carácter

Primitivo y linfático; asentado y tranquilo; zancada de gran extensión. Desconfiado con lo desconocido no así con lo rutinario; potente en el trabajo.

2.2 Características reproductivas del equus asinus

En 1988, Fielding publica una revisión bibliográfica sobre características reproductivas en la burra en la que sólo cita 22 trabajos científicos y concluye que dicha literatura es, además de escasa, de poca calidad, por lo que considera imprescindible incrementar el esfuerzo investigador en esta especie.

En la práctica se extrapolan los conocimientos reproductivos de la yegua a la burra y sin embargo, existen pruebas que demuestran las diferencias existentes entre ambas especies como son la mayor duración del ciclo estral (Meira y col., 1995; Henry y col., 1987^a), del estro (Trimeche y Tainturier, 1995) y de la gestación (Hutchins, 1986). Los trabajos más importantes sobre la reproducción en la especie asnal han evaluado el comportamiento sexual durante el

ciclo estral (Vandeplassche y col., 1981), la edad a la pubertad (Denis, 1995), la ultrasonografía de la actividad ovárica durante el ciclo y la gestación (Meira y col., 1995, 1998^a, 1998^b; Trimeche y Tainturier, 1995; Miró y col., 2003^a) y el estudio de la influencia de la estación del año sobre la actividad sexual (Henry y col., 1987^b; Ginther y col., 1987; Trimeche y Tainturier, 1995).

Respecto al macho también se extrapolan los conocimientos reproductivos del semental al garañón y sin embargo la poca bibliografía existente demuestra las diferencias entre ambas especies (Nishikawa, 1959; Mann y col., 1963, Hutchins, 1986; Henry y col., 1987^c; Thompson Evans, 1992; Trimeche, 1996^a; Gastal y col., 1996...).

2.2.1 Comportamiento sexual

El comportamiento sexual y la organización social en los équidos están ampliamente estudiados contribuyendo así al conocimiento del comportamiento normal de los caballos y ayudando a la interpretación y al diagnóstico de las patologías del comportamiento (Bristol, 1982 y 1987; Ginther, 1983; Mc Donell, 1992). Algunas características del comportamiento sexual de los burros domésticos han sido ampliamente descritas por Nishikawa (1959), Clayton y col. (1981), Kreuchauf (1983), Lodi y col. (1995), Gastal y col. (1996), Henry y col. (1987^b, 1991, 1998, 2001), Taylor y col. (2002) y Miró y col. (2003^b), las diferencias con el semental equino son muchas; de hecho, el garañón tiene un comportamiento sexual muy particular y su conocimiento es de gran utilidad para el desarrollo de las nuevas tecnologías reproductivas.

El comportamiento del garañón en libertad con hembras de su misma especie comienza con un largo cortejo que se interrumpe en varias ocasiones en las que se aleja de la hembra (Henry y col., 1991, 1998, 2001; Lodi y col., 1995), durante el cortejo el macho muerde el cuello, extremidades y zona perineal de la hembra; realiza montas sin erección, movimientos de masticación con la boca, reflejo de Flehmen y expone parcialmente el pene, todo este proceso puede durar entre 10 y 15 minutos (Gastal y col., 1996; Taylor y col., 2002), finalmente el macho se aleja de la hembra, tiene la erección y se produce la monta; el tiempo empleado entre la erección y

la cubrición es muy corto, menos de un minuto (Lodi y col, 1995; Henry y col., 1998, Taylor y col., 2002; Batista, 2003).

Todo este proceso se repite en los estudios realizados con garañones y yeguas en libertad, pero en este caso los diferentes autores indican una menor eficiencia reproductiva, debida, según los autores a la poca participación de la yegua o a la falta de familiaridad con la otra especie (Lodi y col., 1995; Taylor y col., 2000). Tampoco varía el comportamiento sexual cuando se trata de ambientes controlados para la recogida de semen, si el estímulo sexual es el suficiente (Ostrowski y Cortesano, 1987; Morais y col., 1993; Henry y col., 1987^b y 1998; Gastal y col., 1996; Kreuchauf, 1983, Miró y col., 2003^b; Batista, 2003).

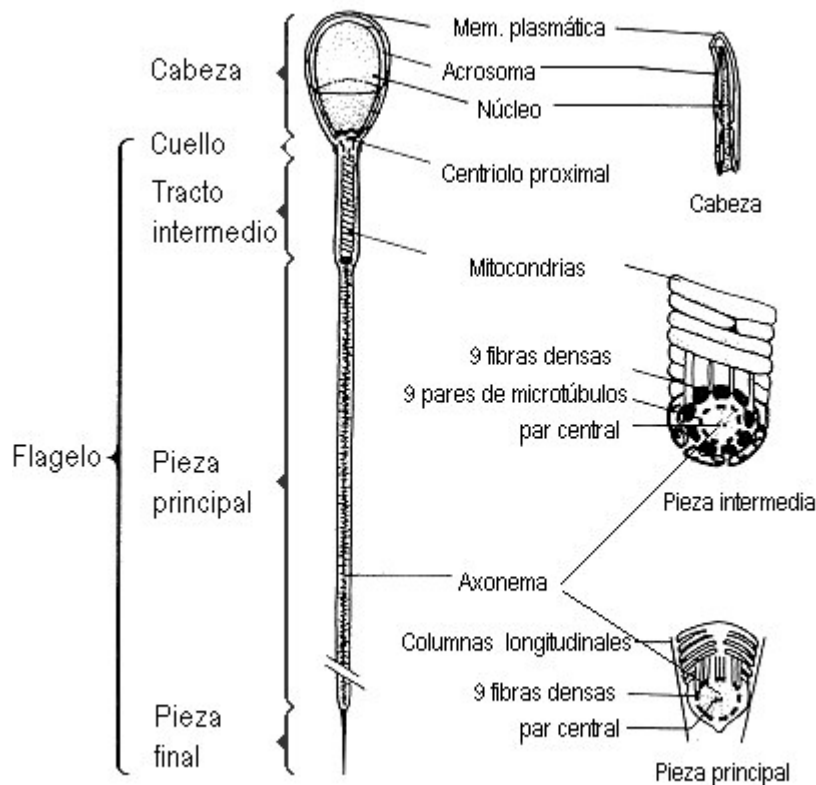
2.3. Características del semen

El semen está formado por los espermatozoides y el plasma seminal y tiene en los asnos una apariencia blanca y uniforme (Morais y col., 1994^{ab}; Gastal y col., 1997). El espermatozoide de los mamíferos tiene la función de unirse al ovocito maduro durante la fecundación para formar el cigoto, para ello debe tener unas características especiales de tal manera que sea capaz de abandonar el tracto reproductivo masculino, atravesar el femenino hasta el lugar de la fecundación y conservar en ese momento la capacidad necesaria para atravesar las envolturas y conseguir la fusión con el ovocito.

La principal característica de esta célula es la de ser haploide y tener una cola o flagelo que le permite el movimiento. En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo, la membrana nuclear, el acrosoma, la lámina postacrosomal y la membrana plasmática. El ADN nuclear está altamente condensado y es transcripcionalmente inactivo, para ello contiene unas proteínas nucleares específicas que se encargan de la compactación de este material genético; en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide existe un compartimento acrosomal de gran importancia en la fecundación, contiene glicolípidos y enzimas necesarias para el reconocimiento y penetración del ovocito y las estructuras que lo rodean. La cola o flagelo es la estructura

responsable del movimiento del espermatozoide y todo él está recorrido por el axonema rodeado por la membrana plasmática, que aquí se denomina membrana flagelar (Millette, 1999).

Fig. 2-1: Morfología del espermatozoide (adaptado de <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap12.html>)



La bibliografía existente sobre la morfología del espermatozoide de asno es escasa y antigua; sin embargo sí existe mucha bibliografía sobre la morfología del espermatozoide de caballo, que está descrito por Dott (1975), Bielanski y Kaczmarek (1979), Amann y Graham (1993^a) y Christensen y col. (1995). En 1959 Nishikawa y en 1963 Mann y col. observan un mayor tamaño y una cabeza más redondeada del espermatozoide de asno con respecto al espermatozoide de caballo; también en 1975 El-Wishy realiza un estudio morfológico de los espermatozoides de epidídimo de burro y de caballo donde describe la mayor incidencia en el burro de inserción abaxial de la pieza intermedia en la cabeza; sin embargo Launay en un estudio publicado en

1990 compara la ultraestructura del espermatozoide de caballo y del espermatozoide de burro de raza Poitou y concluye que la morfología de ambos es idéntica.

El plasma seminal es la fracción líquida que compone el semen; una gran parte procede de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (próstata, glándulas bulbouretrales y glándulas vesiculares) y una pequeña porción del testículo, epidídimo y conducto deferente. El plasma seminal proporciona la energía y el medio adecuado para el movimiento y la supervivencia de los espermatozoides mientras migran por el tracto genital femenino hasta el lugar donde se llevará a cabo la fecundación (Töpfer-Petersen y col., 1995).

Aunque la composición bioquímica del plasma seminal es similar en los mamíferos, se han descrito diferencias entre algunos componentes del plasma seminal del burro y del caballo; podemos destacar la distinta cantidad en magnesio (Morais y col., 1994^a) y el mayor contenido en fructosa del plasma seminal de asno (Trimeche y col., 1996^a, 1997^a).

Es numerosa la bibliografía sobre el plasma seminal equino y sus efectos sobre los espermatozoides, especialmente su acción sobre la motilidad, la capacidad de supervivencia y la resistencia de los espermatozoides a los cambios producidos durante los procesos de refrigeración y congelación (Pickett y col., 1975^a; Amann y col., 1987^{ab}; Jasko y col., 1991, 1992^a; Braun y col., 1994; Graham, 1994; Aurich y col., 1996). El plasma seminal contiene factores capaces de estimular o deprimir la motilidad del semen (Varner y col., 1987^a); la adición de plasma seminal a los espermatozoides obtenidos del epidídimo provoca un aumento inmediato de la motilidad (Braun y col., 1994); sin embargo, la mayoría de los autores han observado una influencia negativa del plasma seminal en la motilidad del semen tras 24 a 48 horas de mantenimiento en refrigeración, tanto del semen de burro (Ferreira y col., 1991) como de caballo (Jasko y col., 1991 y 1992^a; Braun y col., 1994; Brinsko y col., 2000; Rigby y col., 2001; Todd y col., 2001; Carver y Ball, 2002). Por otra parte Troedsson y col. en 1998 comprobaron que cuando el semen es infundido dentro del útero se produce una rápida pérdida de espermatozoides a través de la vagina, y que esta pérdida era mucho mayor si se emplea semen

diluido o descongelado, por lo que creen que el plasma seminal podría tener influencia sobre la permanencia de los espermatozoides en el interior del tracto genital femenino.

En la fase inicial de la eyaculación el caballo elimina una pequeña cantidad de líquido o porción preespermática procedente de la próstata, a continuación se produce la expulsión de la fracción rica en espermatozoides, formada por los espermatozoides y líquido procedente de la cola del epidídimo y las secreciones de la próstata y las glándulas bulbouretrales; esta fracción es eliminada en forma de 3 a 6 chorros de concentración decreciente, de manera que los tres primeros chorros suelen contener el 75% de los espermatozoides del eyaculado (Kosiniak, 1975). Trimeche (1996^a) describe las características del eyaculado del burro de raza del Poitou recogido con vagina abierta y también encuentra una mayor concentración de espermatozoides en una primera parte de la fracción rica del eyaculado ($408.5 \pm 110.5 \cdot 10^6/\text{ml}$) frente al resto del eyaculado ($120.5 \pm 52.6 \cdot 10^6/\text{ml}$) esta primera fracción tiene un volumen variable entre 6 y 23 ml.

Al final del eyaculado se elimina una porción de gel secretada por las glándulas vesiculares; la presencia o no de gel en el eyaculado es variable y su función se desconoce. (Tischner y col., 1974; Amann y Graham, 1993^a; Clément y col., 1992). En el burro la existencia de gel está descrita por todos los autores pero muchos indican una gran mayoría de eyaculados sin gel o con una cantidad menor que en caballos (Nishikawa, 1951-citado por Thompson y Evans, 1992; Gastal y col., 1997; Henry y col., 1987^c; Kreuchauf, 1983; Batista, 2003)

Tanto el volumen del eyaculado como su concentración son parámetros muy variables, y presentan una baja repetibilidad incluso dentro de eyaculados de un mismo semental (Pattie y Dowsett, 1982). En el caso de los asnos la bibliografía es discrepante ya que así como algunos autores describen para los asnos un volumen de eyaculado más bajo que en caballos (Costa y col., 1991^a; Gastal y col., 1997; Mello y col., 2000) otros dicen que es similar (Morais y col., 1994^b; Gokcen y col., 1993; Boeta y Zarco-Quintero, 2000; Batista, 2003); en cuanto a la concentración de espermatozoides en el eyaculado los valores son muy diferentes entre autores pero siempre son mayores que los descritos para caballos (Santos y col., 1995; Morais y col., 1994^b; Gokcen y

col., 1993; Costa, 1991^a); tampoco hay repetitibilidad en el número total de espermatozoides eyaculados (Henry y col., 1987^c; Gastal y col., 1997).

El pH del semen de asno se sitúa entre 6.8 y 8 (Gastal y col., 1997; Morais y col., 1994^a; Batista, 2003), mientras que en caballos el rango normal se sitúa entre 7.2 y 7.6 (Kenney y col., 1983); el pH está inversamente correlacionado con la concentración, de manera que con concentraciones menores el pH tiende a ser mayor (Pickett y col., 1993^a).

Los espermatozoides del semental y del garañón presentan un tipo de movimiento ligeramente circular debido a la implantación paraaxial del flagelo (El-Wishy, 1975; Malmgren, 1997); al menos un 50% (Allen, 1988; Braun, 1989) o un 60% (Love, 1997) de los espermatozoides deben tener un movimiento progresivo. Los datos bibliográficos sobre el estudio de la motilidad espermática del semen de garañón están realizados con pocos animales, así Gastal y col. realizaron en 1997 un estudio con seis garañones cruzados donde la motilidad progresiva descrita es un 72% similar a la encontrada por otros autores (Kreuchauf, 1983; Henry y col., 1987^c; Morais y col., 1994^a; Trimeche, 1996^a; Mello y col., 2000)

Las morfoanomalías más frecuentes del espermatozoide equino son la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y distales, los flagelos en látigo o enrollados y las cabezas y flagelos sueltos (Jasko y col., 1990^a; Clément y col., 1992); la implantación paraaxial del flagelo no se considera anormal en los équidos (Kenney y col., 1983; Amann y Graham, 1993^a; Malmgren, 1997). El porcentaje de espermatozoides anormales puede ser bastante alto incluso entre caballos fértiles (Bielanski y col., 1975, 1979; Dowsett y Pattie, 1982; Jasko y col., 1990^a; Malmgren, 1997). En el asno, el porcentaje de formas anormales es relativamente bajo, alrededor del 16% en la mayoría de los autores (Kreuchauf, 1983; Henry y col., 1987^c; Costa y col., 1991^{ab}; Nishikawa, 1951-citado por Thompson y Evans, 1992; Gokcen y col., 1993; Morais y col., 1994^b; Gastal y col., 1997; Batista, 2003).

2.4. Sistemas de evaluación del semen

Ningún test desarrollado hasta el momento es capaz de predecir de una manera precisa la fertilidad del semen (Graham y col., 1980, 1990, 2001; Malmgren, 1997); dadas las dificultades logísticas y económicas que supone probar la fertilidad “*in vivo*”, el desarrollo de pruebas o análisis encaminadas a determinar la calidad de una muestra y su posible relación con la fertilidad, bien de la muestra o bien del animal del que procede, es uno de los objetivos primordiales en los estudios sobre la conservación de semen en los animales domésticos.

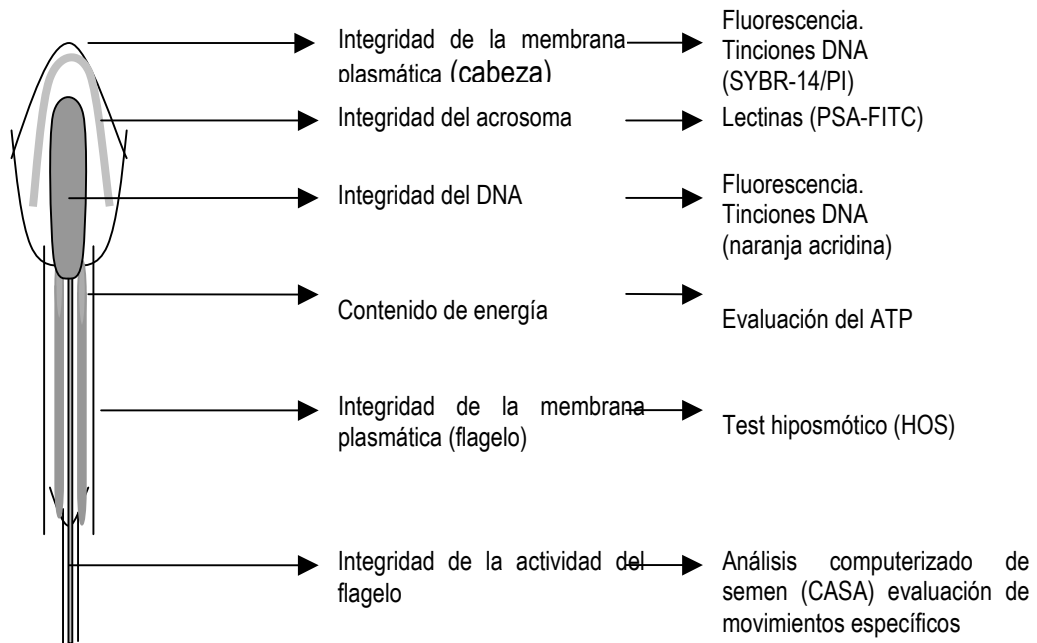
El espermatozoide es una célula altamente especializada, con diferentes compartimentos, cada uno de los cuales cumple funciones muy específicas las cuales no sólo han de desempañarse todas y cada una de ellas, sino que deben ocurrir en el lugar y en el momento oportuno para conseguir fertilizar el ovocito; posiblemente aquí radique la dificultad para desarrollar una prueba de laboratorio indicativa de la fertilidad ya que la mayoría de las pruebas actuales clasifican los espermatozoides según posean o no una única característica, produciéndose una sobreestimación de la fertilidad de la muestra (Amann y col., 1989, 1993^b).

Si conociéramos todos los atributos necesarios que un espermatozoide requiere para ser capaz de llegar y fertilizar el ovocito y los pudiésemos evaluar simultáneamente, podríamos entonces predecir la fertilidad de cada muestra, por ello estos análisis son más eficaces cuantas más características son capaces de evaluar (Amann, 1989; Graham, 1996^a). El uso de técnicas que evalúan varias características a la vez, como la citometría de flujo, o la creación de ecuaciones que correlacionan los resultados de una batería de pruebas permiten obtener mejores correlaciones con la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 1993^b; Graham y col., 1990; Graham, 1996^a; Wilhelm y col., 1996).

Los ensayos de laboratorio desarrollados hasta ahora, a pesar de que no permiten la predicción de la capacidad fecundante de una muestra, sí que permiten identificar aquellos individuos o muestras cuyos espermatozoides carecen de las características seminales consideradas como suficientes para obtener una fertilidad normal y por tanto tienen un alto valor

en la identificación de aquellos individuos o muestras con una fertilidad inferior a la normal (Amann y Hammerstedt, 1993^b).

Fig. 2-2: Regiones o compartimentos del espermatozoide equino y sus correspondientes métodos de evaluación (adaptado de Magistrini y Samper, 2000).



2.4.1. Sistemas de recogida de semen

El método de elección para la recolección de semen en équidos es el uso de una vagina artificial y la mayoría de los machos pueden ser entrenados para servir en una de ellas.

2.4.1.1. Vagina artificial

Esta técnica de recolección nos permite obtener una muestra representativa del eyaculado equino con las mismas características que el de una monta natural, sin afectar al comportamiento futuro de los sementales, pudiendo alternar recogidas con vagina artificial y montas naturales (Yates y Whitacre, 1988; Pickett y col., 1973, 1993^a).

Por lo general, la vagina artificial consiste en una estructura externa más o menos rígida y un forro interno de látex suave; en el extremo del forro se coloca un recipiente para la recolección del semen durante la eyaculación. Entre la caja externa y el forro interno se infunde agua tibia y aire para proveer la presión y temperatura adecuadas para la recolección. Normalmente empleamos temperaturas de 42 a 45°C, hasta un máximo de 50°C (Hillman y col., 1980); previa a la recolección, la vagina artificial se lubrica con una pequeña cantidad de lubricante estéril.

Existe una gran variedad de modelos de vaginas artificiales en el mercado, y los sementales pueden mostrar predilección por uno u otro modelo en función de sus características.

La vagina *Missouri* o *Nasco* es posiblemente la más común y está constituida por un forro de látex doble termosellado que forma una cámara donde se introduce el agua con una válvula que permite la introducción de agua y aire y una funda externa de cuero. Es económica, liviana y de fácil manejo, además permite una estimulación externa del glande del semental (efecto cérvix) o de la base del pene.

La vagina *Polaca* (Tischner , 1975) es un modelo abierto en su extremo distal lo que nos permite la recogida fraccionada del semen. Este método es usado en los Países del Este de Europa y permite recoger sólo los tres primeros chorros del eyaculado que contienen más del 70% de los espermatozoides. Este método de recogida precisa más operarios pero permite obtener eyaculados concentrados eliminando la necesidad de la centrifugación para la eliminación del plasma seminal.

Para llevar a cabo la recolección necesitamos de una hembra en celo o de un maniquí (Kenney y Cooper, 1974; Pickett y col., 1973, 1982 y 1993^a), una vez que el macho monta a la hembra, el pene es desviado hacia un lado y dirigido hacia la vagina artificial.

Está descrita la facilidad de los asnos para adaptarse a la cubrición en un maniquí de recogida (Kreuchauf, 1983; Silva y col., 1997; Taylor y col., 2002) y a la eyaculación en vagina artificial, ya sea con vagina cerrada (Henry y col., 1987^c, 1998; Gastal y col., 1996; Kreuchauf, 1983; Taylor y col., 2002; Trimeche, 1996^a) o abierta (Mello y col., 2000;. Cottorello y col., 2002; Trimeche, 1996^a). En todos estos estudios los asnos han sido capaces de ser entrenados en un corto período de tiempo, también es cierto que en los estudios donde se realizaban recogidas continuas se describen fallos en la recogida (Kreuchauf, 1983; Gastal y col., 1997); algunos autores recomiendan un tiempo máximo de espera, normalmente 1 hora, para la recogida de semen (Gastal y col., 1996, 1997).

2.4.2. Evaluación de la producción seminal

La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos del testículo, los espermatozoides son producidos a partir de la pubertad y de manera continuada durante el resto de la vida; una vez completada su formación son liberados a la luz del túbulo, transportados a través del epidídimo y almacenados en la cola del mismo, desde donde son eliminados mediante la eyaculación o espontáneamente a través de la orina. (Robl y Fissore, 1999).

2.4.2.1. Producción y obtención diaria de espermatozoides

La producción diaria de espermatozoides es el número de espermatozoides producido al día por los testículos (Amann, 1981). Esta producción está altamente correlacionada con el peso testicular y por tanto mediante la estimación del peso y del volumen testicular se puede conocer aproximadamente la producción diaria de espermatozoides (Gebauer y col., 1974; Thompson y col., 1979; Love y col., 1991, Silva y col., 2003).

No podremos estimar la producción diaria de espermatozoides ni por tanto evaluar la función testicular, obteniendo un sólo eyaculado tras un periodo de inactividad sexual, ya que el epidídimo almacena los espermatozoides producidos durante ese periodo. Para agotar las reservas epididimarias es necesario un periodo de entre cuatro y siete días de recogidas diarias estabilizándose de esta manera el número total de espermatozoides recogidos en cada eyaculado.

La obtención diaria de espermatozoides es el número total de espermatozoides eyaculados a lo largo de un intervalo de más de siete días expresado en valores por día (Amann, 1981). En general la frecuencia óptima de eyaculación a lo largo de un periodo que permite determinar la obtención diaria de espermatozoides ha sido fijada en tres veces por semana (Sullivan y Pickett, 1975; Pickett y col., 1983) o dos eyaculados recolectados dos días por semana (Sullivan y Pickett, 1975).

En un estudio sobre la producción espermática y estacionalidad en garañones, Gastal y col. (1997) observaron una baja producción espermática que achacan a la escasa anchura testicular de los machos utilizados; en este estudio también observan que la frecuencia de recogida afecta al número total de espermatozoides por eyaculado en el garañón. En los estudios de semen de burro se utilizan métodos muy variados para la estabilización de las reservas gonadales y también diferentes frecuencias de recogida pero ningún autor describe cuál es el más adecuado y porqué; así para la estabilización de las reservas extragonadales algunos autores usan siete días de recogidas diarias (Silva y col., 1997; Henry y col., 1999; Cottorello y

col., 2002), otros ocho días (Mello y col., 2000) y otros diez días (Santos y col., 1995; Gastal y col., 1997); y la pauta de recogida aún es más variable usando unos autores dos recogidas a la semana con un intervalo de 4 horas (Gastal y col., 1997), otros de un día a la semana (Mello y col., 2000), otros recogidas en días alternos (Santos y col., 1995; Silva y col., 1997; Trimeche, 1996^a) y otros cada tres días (Cottorello y col., 2002).

2.4.3. Evaluación de la calidad del semen

La evaluación de la calidad seminal tiene como objetivo intentar predecir la fertilidad de un macho y procesar adecuadamente los eyaculados para su uso en inseminación artificial; por otro lado también es imprescindible cuando queremos evaluar diferentes procesos de manipulación y conservación de semen y determinar así cuál de ellos mantiene mejor las características de los espermatozoides tras el procesado.

En los équidos existen grandes diferencias en la calidad de los diferentes eyaculados de un mismo individuo (Pattie y Dowsett, 1982), por ello los distintos autores recomiendan realizar el examen de varios eyaculados para determinar la calidad real del semen de ese caballo (Kenney y col., 1983; Rousset y col., 1987; Clément y col., 1992).

2.4.3.1. Número de espermatozoides de un eyaculado

El eyaculado, una vez filtrado y libre de gel, se puede introducir en una probeta graduada para determinar su volumen (Pickett y col., 1993^a). La concentración de semen se puede calcular mediante espectrofotometría (Pickett y col., 1993^a; Graham, 1996^a), cámara hemocitométrica (Kenney y col., 1983; Graham, 1996^a), fluorometría, citometría de flujo o sistemas automáticos de análisis de semen (CASA) (Graham, 1996^a; Verstegen y col., 2002). La espectrofotometría determina la cantidad de luz dispersada al atravesar una muestra y la concentración se determina por comparación con una curva estándar. La concentración de espermatozoides se expresa en millones de espermatozoides por mililitro (spz/ml) y se emplea tanto para calcular el número de espermatozoides por eyaculado como para determinar las dosis de inseminación. (Kenney y col.,

1983; Graham, 1996^a). Multiplicando el volumen libre de gel (V) por la concentración (Co) espermática del eyaculado podremos obtener el número de espermatozoides por eyaculado (NT).

2.4.3.2. Pruebas de motilidad

En un análisis de semen el primer parámetro a analizar tras la recogida es la motilidad, generalmente esta evaluación se realiza mediante la estimación subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles cuando una muestra es observada bajo el microscopio, calculando el porcentaje de células móviles o motilidad total (MT), el porcentaje de células con motilidad progresiva (MP) y la velocidad o el vigor de los espermatozoides en una escala del uno al cuatro o cinco (Kenney y col., 1983; Pickett y col., 1993^a; Malmgren, 1997; Samper, 2000). Este sistema tiene el inconveniente de ser altamente subjetivo, y sus resultados dependen en gran medida de la experiencia del observador, por lo que se han desarrollado sistemas de análisis de semen asistidos por ordenador (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA), lo que permite una mayor objetividad y la evaluación de un mayor número de parámetros para definir el movimiento de los espermatozoides (Jasko y col., 1990^b; Amann y Graham, 1993^a; Malmgren, 1997; Verstegen y col., 2002). Este método presenta algunos inconvenientes como que las determinaciones son lentas de realizar, que se evalúa un menor número de células que mediante la estimación visual (Graham, 1996^a); que el coste es muy elevado (Malmgren, 1997) y que es necesario realizar la estandarización de las distintas especies y la optimización de los equipos y de los procedimientos de trabajo (Verstegen y col., 2002), sin embargo la información recibida, la fiabilidad de los datos obtenidos y la posible repetibilidad de los estudios hacen que estos sistemas computerizados hayan alcanzado un gran auge en los últimos años.

La determinación de la motilidad debe realizarse en semen diluido en un medio adecuado, a una concentración constante entre 25 y 50 x 10⁶ spz/ml (Clément y col., 1992; Malmgren, 1997). Es muy importante el control de la temperatura de todo el equipamiento en contacto con el semen ya que tanto el porcentaje de espermatozoides móviles como las distintas características de la motilidad son máximas a 37 ó 42°C (Amann y Graham, 1993^a; Malmgren, 1997). La profundidad del medio en el que nadan los espermatozoides puede alterar el patrón de su movimiento; una muestra

con 15 a 20 μm de profundidad permite una buena visión en el microscopio, lo que podemos conseguir utilizando una gota de volumen determinado bajo un cubreobjetos de medida conocida o empleando cámaras especiales (Amann y Graham, 1993^a, Malmgren, 1997).

En los sistemas computerizados es necesario estandarizar una serie de para realizar los análisis como la iluminación, la frecuencia de la adquisición de las imágenes, el número de imágenes a analizar, el tamaño mínimo y máximo de la célula y otros valores que determinan las características normales del movimiento como los límites máximo y mínimo de la velocidad o el rango de rectitud (Verstegen y col., 2002). A continuación mostramos los parámetros empleados en diferentes especies:

Tabla 2-1: Parámetros seleccionados en algunos estudios de semen según la especie (Verstegen, 2002)

Parámetros	Toro Farrel, 1998	Conejo Perez, 1996	Cordero Gil, 1999	Perro Iguer-ouada, 2001	Rata Cancel,2000
Sistema CASA	HTR IVOS	HTM-C V 10.5	SM-CMA	HTR IVOS V10	HTR IVOS V10
Frecuencia	30	25	32	60	60
Nº imágenes	30	30		30	60
Contraste	8	10		75	65
Temperatura	37	37	37	38	37
Tamaño (min)	8	10		75	65
Cámara y Profundidad	Microcell 12 μm		Makler 10 μm	Makler 10 μm	HTR 1099 Cannulae 100 μm

En el burro la mayoría de los autores estudiados realizan el análisis de la motilidad mediante la visualización subjetiva de la muestra al microscopio, (Kreuchauf, 1983; Costa y col., 1991^{ab}; Ferreira, y col 1991; Morais y col., 1994^b; Santos y col. 1995; Gastal y col., 1997; Silva y col., 1997; Henry y col., 1999 y 2001; Cottorello y col., 2002); Trimeche (1996^a) utiliza un sistema computerizado del semen para la evaluación del semen de asno del Poitou y Batista (2003) para

la evaluación de semen de asno Catalán; Trimeche emplea para este análisis los siguientes parámetros:

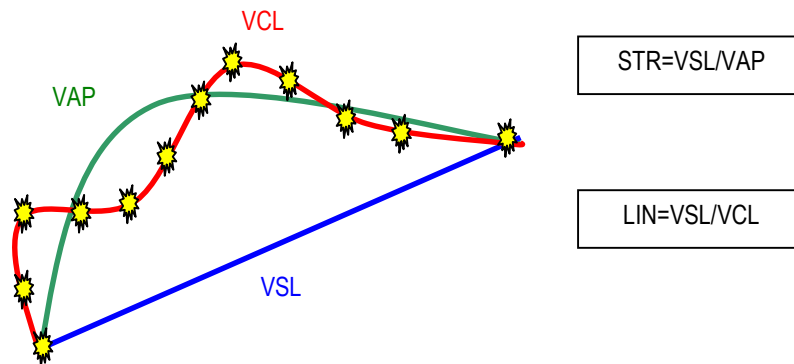
Tabla 2-2: Parámetros utilizados en el análisis de la motilidad en semen de asno mediante un sistema computerizado (Trimeche, 1996^o)

Marca	ATS 40
Temperatura	37°
Frecuencia	40
Nº de imágenes	15-30
Tamaño	10-30 pixels
Cámara y profundidad	Makler 10 μm

Los parámetros e índices de motilidad determinados por los sistemas computerizados son:

- Velocidad curvilínea (VCL): la media de la velocidad utilizada por los espermatozoides desde el punto actual al punto real siguiente. ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad promedio (VAP): velocidad del recorrido promedio realizado por el espermatozoide ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad rectilínea (VSL): velocidad del recorrido medido en línea recta desde el punto inicial al punto final ($\mu\text{m/s}$).
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH): Desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides móviles ($\mu\text{m/s}$).
- Frecuencia de batida (BCF): frecuencia de batida del flagelo de los espermatozoides móviles (Hz).
- Índice de rectitud (STR): estima la proximidad del recorrido del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VAP (%).
- Índice de linealidad (LIN): estima la proximidad de la trayectoria real del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VCL (%).

Fig. 2-3: Representación esquemática de diferentes parámetros evaluados por un sistema computerizado de análisis de semen



Trimeche (1996^a) recoge algunas características del movimiento de los espermatozoides en el semen de garañones de raza Poitou y aunque no realiza ningún experimento para la estandarización del proceso, utiliza siempre los mismos parámetros de trabajo antes expuestos y los datos que obtiene del semen fresco diluido antes de los experimentos son bastante constantes; Batista en 2003 publica los datos estandarizados de las características de la motilidad de los espermatozoides de burro de raza Catalana evaluados mediante un sistema CASA, en la siguiente tabla podemos observar los datos de los estos dos trabajos:

Tabla 2-3: Características de la motilidad del semen de burro.

Característica	Trimeche, 1996 ^a	Batista, 2003
VCL (μM)	63,3 ± 6,8	80,2 ± 51,72
VSL (μM)	44,6 ± 4,8	49,8 ± 43,18
LIN (%)	77,5 ± 7,0	60,5 ± 28,79
VAP (μM)	40,1 ± 3,3	59,39 ± 43,04
ALH (μM)	3,9 ± 0,5	2,36 ± 2,05

2.4.3.3. Longevidad de la motilidad

El estudio de la longevidad del semen permite identificar algunos sementales subfértiles cuyas características seminales son normales (Kenney y col., 1983) y evaluar distintos procesos de manipulación y conservación de semen y su uso para inseminación artificial (Clément y col., 1992; Vidament y col., 1998). Se puede determinar la longevidad del semen puro almacenándolo en condiciones anaerobias, en oscuridad, a 38°C o a 22°C, en condiciones normales el semen pierde la mitad de la motilidad en la primera hora, pero mantiene durante 6 horas al menos un 10% de motilidad progresiva (Kenney y col., 1983; Thompson y Evans, 1992). También se puede determinar la motilidad espermática del semen diluido en un medio adecuado y almacenado a 4° C tras 24 ó 48 horas, este proceso se realiza por algunos centros como parte rutinaria del espermiograma y parece tener una alta correlación con la fertilidad (Busson y col., 1987; Clément y col., 1992; Samper, 2000); el semen debe tener una longevidad de la motilidad mayor a 2 horas (Kenney y col., 1983; Thompson y Evans, 1992).

Silva y col. en 1997 evalúan dos sistemas de congelación de semen de garañón manteniéndolo a 37° C en el baño maría durante cuatro horas, en esta prueba se puede observar que la motilidad va disminuyendo progresivamente siendo prácticamente la mitad a las dos horas y a las cuatro horas conserva un 5% de motilidad progresiva.

2.4.3.4. Morfoanomalías

La evaluación de las morfoanomalías espermáticas se puede realizar sobre preparaciones húmedas o sobre preparaciones fijadas sobre un portaobjetos.

Para la observación de preparaciones húmedas el semen se fija en formol tamponado y se observa bajo contraste de fases a 1000x aumentos en una gota colocada entre porta y cubre (Santos y col., 1995; Graham, 1996^a; Malmgrem, 1997; Love, 1997), con este sistema se obtiene buena calidad en las muestras (Love, 1997; Samper, 2000), pudiendo conservarse durante meses (Kenney y col., 1983; Graham, 1996^a). Para las muestras fijadas se utilizan muchas tinciones: tinta

china, tinción de Harris (Davis y col., 1993), eosina-nigrosina (Kenney y col., 1983), eosina-anilina (Parlevliet y Colenbrander, 1999), Giemsa o Spermac (Jasko, 1992^b; Graham, 1996^a; Malmgrem, 1997); estas técnicas permiten el análisis con un microscopio convencional y la identificación de otros tipos celulares existentes en el eyaculado como eritrocitos, células epiteliales, inflamatorias o inmaduras (Braun, 1986; Graham, 1996^a).

Otras técnicas empleadas para la evaluación de la morfología son la microscopía electrónica (Rao Veeramachaneni y Sawyer, 1996) o los sistemas de análisis morfométricos automatizados (Automated Sperm Morphometric Analysis, ASMA) (Davis y col., 1993; Ball y Mohammed, 1995; Gravance y col., 1996; Magistrini y col., 1996; Casey y col., 1997; Hidalgo y col., 2003).

En la bibliografía consultada sobre semen de garañón la mayoría de los autores analizan las morfoanomalías sobre muestra fresca, algunos fijándola en una solución de formol tamponado (Santos y col., 1995; Cottorello y col., 2002) y otros analizándola inmediatamente sin fijar (Mello y col., 2000; Gastal y col. 1997). Otros autores (Silva y col., 1997) utilizan dos métodos a la vez, por un lado la tinción de Karras descrita por Papa y col. (1989) y por otro la microscopía de contraste de fase; clasificando las morfoanomalías por su lugar de aparición, cabeza, pieza intermedia y cola. Batista (2003) evalúa las morfoanomalías espermáticas del burro Catalán junto a la vitalidad mediante la tinción de eosina-negrosina.

Las morfoanomalías se clasifican en función de su posible origen como mayores (cabeza anormal, gota citoplasmática proximal, anomalías de la pieza intermedia) y menores (cabeza suelta, gota citoplasmática distal y anomalías del flagelo) (Jasko y col., 1990^a).

En el asno, el porcentaje de formas anormales es relativamente bajo y las anomalías más frecuentemente encontradas están en la pieza intermedia (Santos y col., 1995; Mello y col., 2000; Morais y col. 1994^b) y en el flagelo (Gastal y col. 1997, Silva y col., 1997; Batista, 2003).

2.4.3.5. Evaluación de la membrana plasmática de la cabeza

La integridad de la membrana plasmática de la cabeza es un buen indicador de la viabilidad espermática. Existen diferentes métodos para su evaluación, los más utilizados utilizan colorantes como la eosina o tripán azul, (Kenney y col., 1983; Didion y col., 1989), o la tinción Spermac (Oettlé, 1986), que sólo atraviesan las membranas dañadas.

También han sido empleadas para determinar la viabilidad sustancias fluorescentes (Stöhr y Vogt-Schaden, 1980; Garner y col., 1986, 1994; Casey y col., 1993), algunos compuestos como el diacetato de carboxifluoresceína penetran las membranas intactas (CFDA) (Garner y col., 1986) o el SYBR-14 (Garner y col., 1994), mientras otras, como el yoduro de propidio, (PI) sólo atraviesan las membranas dañadas e inducen fluorescencia en las células inviables (Garner y col., 1986; Graham, 1996^a). La utilización de sustancias fluorescentes permite un buen contraste entre las células vivas y muertas y aunque requiere un equipamiento específico para su evaluación permite evaluar las muestras mediante citometría de flujo lo que aumenta la objetividad de la prueba y el número de células analizadas (Graham, 1990, 1996^a y 2001).

2.4.3.6. Evaluación de la membrana acrosomal

La evaluación del acrosoma de los mamíferos puede realizarse mediante microscopía óptica usando tinciones específicas como la triple tinción (Talbot y Chacon, 1981; Varner y col., 1987^b; Magistrini y Palmer, 1991), tinción de Karras (Papa y col., 1989) o Spermac (Oettlé, 1986) o mediante inmunofluorescencia indirecta empleando anticuerpos monoclonales (Malmgren y col., 1994) dirigidos contra un componente de la matriz acrosomal (Blach y col., 1988) o de la superficie del acrosoma (Zhang y col., 1990).

También se han empleado sustancias fluorescentes como la clortetraciclina (CTC) (Varner y col., 1987^b) o las lectinas como la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) o la aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA) unidas a una sustancia fluorescente que atraviesan la membrana acrosomal sólo en el caso de que esté dañada (Garner y col., 1986; Liu y Baker, 1988; Cross y Meizel, 1989; Farlin

y col., 1992; Casey y col., 1993; Graham, 1996^a y Graham y Squires, 2001). El uso de sustancias fluorescentes combinado con la citometría de flujo permite la evaluación de un gran número de células y de varias características de los espermatozoides al mismo tiempo en un solo análisis (Garner y col., 1986; Graham y col., 1990, 1996^a; Malmgren, 1997; Graham y Squires, 2001), de hecho en menos de un minuto se evalúan 50.000 espermatozoides a un coste razonable (Graham y Squires, 2001).

Para la evaluación del acrosoma de garrón Silva y col. (1997) emplean la tinción de Karras según Papa y col. (1989); Trimeche (1996^a) utiliza el protocolo de Cross y col. (1986) usando PSA-FITC y analizando las muestras mediante microscopía de fluorescencia.

2.4.3.7. Evaluación de la membrana plasmática del flagelo

El test de endósmosis o test hiposmótico (HOS) evalúa la capacidad de transporte selectivo de la célula y por tanto la integridad de la membrana del flagelo. Sometiendo a los espermatozoides a un medio hiposmótico el agua penetra en la célula provocando la dilatación de la zona del flagelo (Jeyendran y col., 1992). Este test es una parte importante en la evaluación del semen de muchas especies como el porcino (Martín Rillo, 1996) o el ovino (Garde, 1992); en caballos se han realizado algunos estudios al respecto y su relación con la fertilidad no ha sido establecida claramente (Caiza de la Cueva y col., 1997; Malmgren, 1997; Neild y col., 1999, 2003), aunque sí parece estar correlacionado con la capacidad de congelación del semen (Vidament y col., 1998). En los últimos años la mayoría de los laboratorios lo han incluido tanto en sus análisis rutinarios de semen como en los de investigación, es un test fácil de realizar, con un coste mínimo y que aporta información adicional al espermiograma.

Trimeche (1996^a), Trimeche y col. (1998) y Batista (2003) utilizan una adaptación de los procedimientos usados en la especie humana para la realización del test hiposmótico, empleando una solución con una osmolaridad de 150 mOsm, una relación de dilución 1/10 y una incubación de 60 ó 20 minutos respectivamente.

2.4.3.8. Otras pruebas

El núcleo del espermatozoide contiene toda la información genética almacenada en el DNA (Kenney y col., 1991; Betsch, 1992). La estabilidad de esta cromatina o DNA se puede evaluar con el uso de la citometría de flujo (Evenson y col., 1990, 1995; Ballachey y col., 1988; Kenney y col., 1995; Love y Kenney, 1998) y la tinción fluorescente del DNA con naranja de acridina según esté dañado o no (Tejada y col., 19984); Trimeche (1996^a) utiliza esta tinción para el estudio del núcleo en espermatozoides de garrón de raza Poitou para la comparación de distintos protocolos de congelación de esperma.

Las mitocondrias se encuentran en la pieza intermedia del espermatozoide y son las encargadas de producir la energía para del movimiento del mismo (Mann, 1945-citado por Magistrini y Samper, 2000), recientemente se han desarrollado dos técnicas diferentes para evaluar la función mitocondrial, la primera evalúa el contenido de ATP mediante bioluminiscencia (Magistrini y col., 1997) y la segunda emplea sustancias fluorescentes como la Rodamina 123 (Evenson y col., 1982; Auger y col., 1989; Graham y col., 1990) ó el JC-1 (Thomas y col., 1998) que evalúan la funcionalidad mitocondrial.

Mediante una triple tinción fluorescente se puede realizar en una sola prueba la evaluación de la viabilidad espermática, de la integridad de la membrana y de la función mitocondrial (Graham y Squires, 2001). De hecho en los últimos años son muchos los artículos que emplean diferentes combinaciones de tinciones fluorescentes para la evaluación de los distintos sistemas de conservación de semen, por ejemplo PI-PSA-R123 usado por Graham y col. en 1990; SNARF-PI-PSA usado por KavaK y col. (2001) y CFDA-PI-PA usado por Ecot y col. (2001) y Brinsko y col. (2003).

Las pruebas hasta ahora expuestas evalúan una sola característica de los espermatozoides o un número pequeño de las muchas que necesita para llevar a cabo la fertilización. Las pruebas de fertilización “*in vitro*” evalúan varios parámetros funcionales de la célula simultáneamente, pero requieren más tiempo y experiencia para su realización y son más

costosos que los exámenes clásicos (Gould y col., 1983; Graham, 1996^a). Por un lado existen los test de fertilización *in vitro* heteróloga, en los que se emplean ovocitos de hámster desprovistos de zona pelúcida (Brackett y col., 1982, Wilhelm y col., 1996) y por otro la fertilización *in vitro* homóloga que en los équidos no ha alcanzado un grado suficiente que permita su empleo dentro de los exámenes de fertilidad del semen (Graham, 1996^b).

Si queremos tener un estudio completo del semen no podemos olvidarnos del plasma seminal. La composición del plasma seminal ha sido objeto de estudio (Mann, 1975; Kosiniak, 1975; Magistrini y col., 1995) y se ha intentado establecer una relación entre esta composición y la fertilidad (Kenney y col., 1983; Betsch, 1992; Macpherson y col., 2001), con la existencia de alguna patología (Turner y Sertich, 2001) o con la capacidad de resistir los procesos de refrigeración y congelación (Amann y col., 1987^{ab}; Carver y Ball, 2002).

2.4.4. Factores que afectan a la producción y calidad del semen equino

La época del año, la edad, el tamaño testicular y la frecuencia de la eyaculación son los principales factores que afectan a la producción y calidad del semen equino (Amann y col., 1979; Johnson y Thompson, 1983); la valoración real de estos factores es muy difícil ya que están interrelacionados entre sí. Otros factores como son la nutrición, el ambiente, la producción hormonal o ciertos fármacos son desconocidos en gran medida.

2.4.4.1. Efecto de la estacionalidad

La estacionalidad parece tener un efecto escaso en la reproducción del asno. En la burra Henry y col. (1987^b) observan diferencias significativas en la duración del ciclo estral a lo largo del año, sin embargo Ginther y col. (1987), Oliveira y col. (2002) y Miró y col. (2003^a) observan que la actividad sexual de la hembra asnal es constante a lo largo de todo el año.

El semental es sexualmente activo y produce espermatozoides durante todo el año, en el garañón no parece que exista una marcada estacionalidad sexual, así ni Kreuchauf (1983) ni

Henry y col. (1999) encontraron diferencias en cuanto a la libido, ni en las características ni en la calidad seminal a lo largo de todo el año. Gastal y col. (1991^a) encontró diferencias tanto en la motilidad espermática como en el porcentaje de espermatozoides anormales y el pH seminal según los meses del año, pero no así en la libido (Gastal y col. 1991^b); sin embargo en un trabajo posterior (Gastal y col.,1997) sólo encuentra diferencias en el pH del semen que es menor en verano.

2.4.4.2. Tamaño testicular

El tamaño testicular permite estimar la producción y obtención diaria de espermatozoides e identificar aquellos animales con una baja eficiencia de producción espermática (Thompson y col., 1979; Pickett y col., 1993^a).

Gastal en 1997 en un estudio de producción espermática y estacionalidad realizado con seis garañones durante un año recogió las medidas testiculares mensualmente usando el calibre de Gebauer y observó una anchura escrotal media de 9.2 ± 0.1 cm apreciando diferencias significativas entre los meses del año, siendo menor (8.4 cm) en mayo y junio. Costa y col. (1991^b) en un estudio con 112 Burros de raza Pega mide la circunferencia escrotal obteniendo un rango entre 10.4 y 11.9 cm; Morais y col. (1993) comparan las medidas y el volumen de los testículos derecho e izquierdo no encontrando diferencias significativas entre ambos:

2.4.4.3. Efecto de la edad

La producción diaria de espermatozoides está influida directamente por la edad; los caballos jóvenes tienen menor producción espermática por gramo de parénquima testicular y testículos de menor tamaño que los sementales adultos, en los que la producción espermática por gramo de parénquima se mantiene constante con la edad manteniendo los mismos niveles de producción espermática más allá de los 20 años (Pickett y col., 1983).

El-Wishy (1974) encuentra en los garañones jóvenes una menor reserva espermática testicular y epididimaria. Costa y col. en 1991^b sólo observan diferencias significativas en la concentración espermática entre garañones de menos de tres años y mayores de 12 años.

Tabla 2-4: Efecto de la edad en la concentración espermática del semen de asno (Costa y col. 1991^d)

	Edad 1,5-3,9	Edad >12
Concentración (x10 ⁶)	289,7-338	188,3-207

2.4.4.4. Frecuencia de eyaculación

La frecuencia de la eyaculación es el factor que más afecta a la obtención diaria de espermatozoides (ODE). La ODE, cuando los sementales son sometidos a un ritmo diario de recogida de semen, es mayor durante los primeros días, y se estabiliza, una vez que las reservas extragonadales de espermatozoides se han eliminado, entre los días 5 y 7 (Gebauer y col., 1974^{ab}; Amann y col., 1979).

Gastal y col. (1997) comparan dos tipos de eyaculados de garañón, uno es precedido por dos recogidas de semen la semana anterior y el otro es precedido por una sola recogida la semana anterior y encuentran diferencias significativas entre ambos eyaculados en el número total de espermatozoides.

La frecuencia óptima de recogida de semen en el caballo se ha establecido en tres por semana, para la estabilización de las reservas gonadales y la frecuencia de recogida en el garañón se han empleado diversos protocolos en los estudios consultados.

2.4.4.5. Otros factores

En algunas especies la excitación sexual previa a la monta puede incrementar la obtención de espermatozoides, en el caballo según Ionata y col. (1991) provoca un aumento del volumen total del eyaculado y una disminución de la concentración, pero no afecta a la obtención diaria de espermatozoides.

Otros agentes como los tratamientos hormonales (Berndtson y col., 1979; Squires y col., 1982; Amann, 1993^c; Squires y col., 1997) o sustancias tóxicas pueden alterar la función espermática. (Amann, 1993^c).

2.4.5. Producción y calidad de semen y su relación con la fertilidad

A lo largo del tiempo los científicos han intentado desarrollar pruebas de laboratorio que pudieran con alguna precisión predecir la capacidad fecundante de un semental o de una muestra seminal.

En la realización de pruebas de fertilidad "*in vivo*" la fertilidad intrínseca de la hembra representa un factor de variabilidad difícilmente mensurable. En los équidos realizar estas pruebas con un número suficiente de hembras representa un coste económico muy alto y en el caso de animales en peligro de extinción como muchas razas de burros es totalmente imposible; por esta razón la mayoría de los laboratorios emplean pruebas de laboratorio para la evaluación del semen y cuando hacen pruebas "*in vivo*" utilizan un número insuficiente de hembras (Amann y col., 1992). Para Amann (1989), en las pruebas de fertilidad generalmente es mucho mayor la "fertilidad real" de una muestra que la "fertilidad observada". Excepto en algunas especies, establecer la fertilidad real de una muestra o un individuo es muy difícil, y por tanto correlacionar las pruebas de laboratorio y esta fertilidad aparente tendrán un escaso valor.

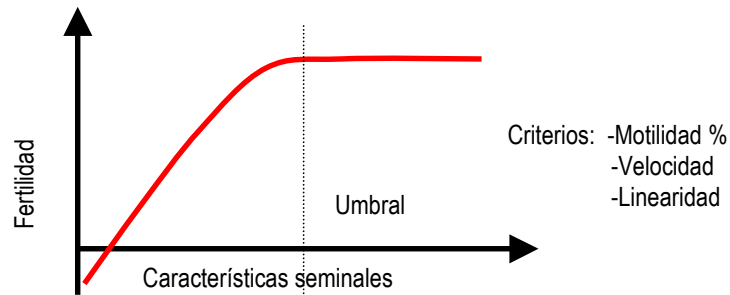
Por otro lado, en los distintos trabajos se estima la fertilidad mediante parámetros diferentes: determinación del número de yeguas preñadas por ciclo (Dowsett y Pattie, 1982;

Volkman y Van Zyl, 1987; Samper y col., 1991; Clément y col., 1992; Jasko y col., 1990^a), en el primer ciclo (Parlevliet y Colenbrander, 1999), por cubrición (Dowsett y Pattie, 1982), por temporada (Dowsett y Pattie, 1982; Samper y col., 1991), número de potros nacidos (Samper y col., 1991; Parlevliet y Colenbrander, 1999), o número de embriones recuperados tras la inseminación (Jasko y col., 1992^c; Voss; 1993; Wilhelm y col., 1996), lo que hace imposible la comparación entre los diferentes estudios (Clément y col., 1992; Malmgrem, 1997).

Las pruebas de laboratorio existentes evalúan una sola característica del espermatozoide o como mucho un pequeño grupo de ellas al mismo tiempo. El espermatozoide es una célula altamente especializada, con diferentes compartimentos, y todos ellos cumplen funciones muy específicas las cuales, no sólo han de desempeñarse todas, sino que deben de tener lugar en un sitio determinado y en el momento oportuno para conseguir fertilizar el ovocito; al evaluar una sola de estas características producimos una sobreestimación de la fertilidad de la muestra (Amann, 1989; Amann y Hammerstedt, 1993^b); un ejemplo que proponen Graham y Squires (2001) es el siguiente: en un estudio determinado nos podríamos encontrar que todos los espermatozoides con motilidad tuviesen dañado el acrosoma, en este caso la correlación entre fertilidad y motilidad será muy baja. Por todo ello el uso de técnicas que evalúan varias características a la vez, como la citometría de flujo, o la creación de ecuaciones que correlacionan los resultados de una batería de pruebas, permite obtener mejores correlaciones con la fertilidad (Amann y col., 1989 y 1993^b; Graham y col., 1990, 1996^a; Wilhelm y col., 1996).

También es posible que como afirma Saacke (citado por Samper, 2000), que determinar la relación entre fertilidad y ciertos parámetros no sea posible de fijar por encima de un umbral determinado, como puede verse en la figura 2.4:

Fig. 2-4: Relación entre fertilidad y características seminales, por debajo del umbral la correlación entre estos criterios y la fertilidad es posible, pero por encima no se puede establecer correlación alguna (Saake, 1983 citado por Magistrini y Samper, 2000)



En el caso de los caballos el volumen presenta una escasa correlación con la fertilidad, sin embargo, Jasko y col. (1992^c), empleando dosis con un número constante de espermatozoides observaron que la fertilidad era superior empleando volúmenes de inseminación de 10ml frente a 50 ml, y Leipold y col. (1998), obtuvieron mejores índices de gestación con volumen de inseminación de 0.5 ml frente a 5 ml de semen descongelado.

La fertilidad aumenta al incrementar el número de espermatozoides inseminados hasta un valor máximo, a partir del cual se estabiliza (Amann, 1989); como el semental eyacula una cantidad de espermatozoides mucho mayor del valor límite, el volumen y la concentración del semen no presentan correlación con la fertilidad salvo que el número de espermatozoides esté por debajo de este límite (Graham, 1996^a; Gahne y col., 1998). Las dosis mínimas empleadas en caballos con semen fresco tienen 100 millones de espermatozoides con motilidad progresiva (Demick y col., 1976); con semen refrigerado 500 y hasta 1000 x 10⁶ de espermatozoides (Pickett y Amann, 1987; Jasko y col., 1992^c); y si se aumenta este número hasta 2000 x 10⁶ espermatozoides no se produce una mejora de la fertilidad (Squires y col., 1998); con semen descongelado Samper y col. (1991) observaron que no se producían gestaciones con menos de 150 x 10⁶ y que la fertilidad no aumenta sobrepasar los 800 x 10⁶ de espermatozoides. Trimeche (1996) realiza un estudio de inseminación con semen congelado de burro en el que emplea dosis de 240 x 10⁶, 400 x 10⁶ o 600 x 10⁶ espermatozoides totales, consiguiendo una gestación con 400 x 10⁶ espermatozoides que abortó antes del día 22, la dosis utilizada en

experimentos posteriores es de 600×10^6 espermatozoides de semen congelado y con 400×10^6 espermatozoides de semen fresco, obteniendo gestaciones con semen congelado en yeguas (3/13) y ponis (1/6) y con semen fresco en yeguas (7/3), ponis (5/6) y burras (2/7); cuando utiliza el diluyente T2-94 usa 600.10^6 espermatozoides en cada dosis y consiguiendo gestaciones en burras cuando disminuye la concentración de glicerol (8/21) (Trimeche y col., 1998).

La motilidad del semen presenta una correlación escasa con la fertilidad (Dowsett y Pattie, 1982; Francl y Amann, 1987; Samper y col., 1991; Clément y col., 1992; Jasko y col., 1992^c; Bedford y col., 1995; Parlevliet y Colenbrander, 1999); sin embargo la estimación de la motilidad continúa siendo el parámetro más empleado para la predicción de la capacidad fecundante del semen (Boyle, 1996; Graham, 1996^a).

Los sistemas automáticos de análisis de la motilidad permiten una mayor objetividad pero aún hay pocos datos sobre su relación con la fertilidad (Jasko y col., 1992^d; Palmer y Magistrini, 1992).

Tabla 2-5: Coeficientes de correlación entre las características cinéticas del semen y la fertilidad en el caballo ($p < 0.01$) (Jasko y col., 1992^d)

Estimaciones subjetivas:	
Motilidad total	0.40
Motilidad progresiva	0.46
Análisis automático de motilidad	
Motilidad total	0.34
Motilidad progresiva	0.27
Velocidad media	0.30

En el asno del Poitou, Trimeche (1996^a), no encontró correlación entre la fertilidad y la motilidad y las características del movimiento; sin embargo apreció diferencias significativas en

estos parámetros entre los eyaculados que dejaron hembras preñadas y aquellos que no las preñaron; como puede observarse en la siguiente tabla:

Tabla 2-6: Comparación de la motilidad, VCL, ALH y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y ondulante de eyaculados que engendraron o no gestaciones. (Trimeche, 1996^a)

	DG+ Nº de eyaculados (n=7)	DG- Nº de eyaculados (n=30)
Motilidad (%)	44,2 ± 5,7	38,7 ± 3,4 *
VCL (µm/s)	56,2 ± 5,2	48,1 ± 4,7 *
ALH (µm)	2,8 ± 0,5	2,4 ± 0,4 *
Progresivos-ondulantes (%)	36,2 ± 3,2	31,2 ± 4,2 *

Los valores están expresados en media ± SD (P<0,05)

El porcentaje de espermatozoides móviles del semen, diluido en un medio adecuado y almacenado a 4° C tras 24 ó 48 horas, parece tener una alta correlación con la fertilidad en el caballo (Busson y col., 1987; Clément y col., 1992; Samper, 2000).

En cuanto al estudio de las morfoanomalías del semen de caballo y su relación con la fertilidad, hay discrepancias entre los autores, mientras Dowsett y Pattie (1982) no encontraron correlación, Jasko (1990^a) obtuvo una correlación de 0.34 (p<0.01). Bielanski y col. (1982) observaron en sementales de alta fertilidad una presencia menor de un 20% de morfoanomalías totales. En cuanto el tipo de morfoanomalías, Hurtgen y Johnson (1982) examinaron sementales con una alta incidencia de anomalías acrosómicas que eran fértiles; Jascko y col. (1990^a) encontraron, sin embargo, que el porcentaje de morfoanomalías mayores presentó un coeficiente de correlación de -0.79 (p<0.05) con la fertilidad, al igual que Clément y col. (2001^a).

El porcentaje de espermatozoides vivos y morfológicamente normales parece ser el parámetro que mejor predice la fertilidad de los potros para Parlevliet y Colenbrander (1999). Según las normas de la Society for Theriogenology (Kenney y col., 1983) este parámetro también es

el más importante para la clasificación de los sementales como aptos o no aptos en un examen de fertilidad.

Los trabajos sobre la membrana plasmática del flagelo del espermatozoide no han conseguido establecer su relación con la fertilidad en el caballo (Caiza de la Cueva y col., 1997; Malmgrem, 1997; Neild y col., 1999), aunque este parámetro parece estar correlacionado con la capacidad de congelación del semen (Vidament y col., 1998); los estudios de integridad de la membrana del flagelo en burros (Trimeche, 1996^a; Batista, 2003) no han intentado buscar su correlación con la fertilidad.

Se han encontrado diferencias en la estructura y estabilidad de la cromatina del núcleo de los espermatozoides entre machos fértiles y subfértiles (Ballachey y col., 1988; Betsch, 1992; Kenney y col., 1995; Evenson y col., 1980 y 1995; Love y Kenny, 1998). En asnos Trimeche en 1996 utiliza la metodología descrita por Tejada y col. en 1984 para el estudio del núcleo en espermatozoides de garañón de raza Poitou en estudio de distintos protocolos de congelación de esperma, sin embargo no lleva a cabo una comparación del efecto de este parámetro con la fertilidad.

En cuanto a la composición del plasma seminal se ha estado intentando establecer una relación entre esta composición y la fertilidad (Kenney y col., 1983; Betsch, 1992; Macpherson y col., 2001), o con la capacidad de resistir los procesos de refrigeración y congelación (Amann y col., 1987^a; Carver y Ball, 2002); sin llegar a resultados concluyentes.

Otro tipo de exámenes especiales, como la respuesta a los inductores de la reacción acrosómica o los test de fertilización "*in vitro*" heteróloga u homóloga no se suelen realizar en los espermioigramas rutinarios y por lo general no utilizan un número suficientemente amplio de muestras como para poder establecer su relación con la fertilidad. Estos exámenes, sin embargo, evalúan características de la célula espermática necesarias para la fertilización y son una importante ayuda en la investigación (Brackett y col., 1982; Pantke y vol., 1995; Fazelli y col., 1995; Graham, 1996^a y Graham y Squires, 2001).

2.5. Sistemas de conservación del semen

La refrigeración y conservación a corto plazo del semen puede ser un medio muy importante para la difusión de material genético entre poblaciones escasas y aisladas; ya que asegura un lapso de tiempo suficiente para el traslado de los gametos (espermatozoides) hasta el lugar en que se encuentra la hembra con un bajo coste, permitiendo el mayor y mejor empleo de los sementales de alto valor genético. La congelación de semen tiene una importancia vital ya que nos permite conservar indefinidamente material genético de razas en peligro de extinción.

Históricamente los asnos han sido muy solicitados para la producción mular, la dificultad que presentan los garañones para cubrir hembras de otra especie hizo que se comenzara a usar la inseminación artificial con semen fresco y refrigerado. Actualmente se busca el empleo de estas técnicas como medio de conservación de algunas razas que se encuentran en extinción como pueden ser la raza Catalana, la Zamorano-Leonesa y la Poitou en Francia.

2.5.1. Refrigeración del semen

Rusia y China fueron los primeros los países promotores de la inseminación artificial en los équidos a finales del siglo XIX y la aplicación a gran escala. Años después McKenzie y col. (1939) iniciaron los estudios sobre recogida de semen, procesado e inseminación en el caballo y en el burro en los Estados Unidos. El semen refrigerado en el caballo se lleva usando desde entonces para la inseminación de yeguas con resultados muy satisfactorios (Pickett y Amann 1987). El uso de estas técnicas en el ganado asnal ha ido decayendo según ha desaparecido el uso de las mulas y los burros en el campo; en Sudamérica este ganado se sigue utilizando para el transporte en zonas escarpadas, por ello la mayoría de los artículos sobre inseminación artificial con semen refrigerado de asno provienen de autores sudamericanos como Boeta, Cottorello, Ferreira, Mello, Ostroxski, Oces o Santos.

Algunos artículos han evaluado los factores que afectan a la viabilidad del semen de burro conservado a 4° C (Ferreira y col., 1991; Mello y col., 2000; Santos y col., 1995; Boeta y

Zarco-Quintero, 2000; Cottorello y col., 2002; Miró y col., 2003^c) y otros aportan datos de fertilidad en el uso de este semen para la producción mular (Ferreira y Henry, 1992; Boeta y Zarco-Quintero, 2000).

La dilución del semen para su uso en fresco aporta una serie de ventajas (Pickett y col., 1993^a); como la prolongación de la supervivencia de los espermatozoides, la protección de los espermatozoides de las condiciones ambientales adversas, el tratamiento antibiótico del semen cuando éste contiene microorganismos patógenos, la mejora de la viabilidad de los espermatozoides de algunos sementales de baja fertilidad, la estimación adecuada de la motilidad y el aumento del volumen del eyaculado con el fin de repartirlo entre varias hembras.

Varner y col. (1989) comprobaron que los espermatozoides sufrían menos daños cuando se conservaban a 5° C que cuando se hacía a 20°C. Más adelante Pickett (1995) en una revisión bibliográfica, señala que el semen refrigerado a 20° C comienza a perder fertilidad a partir de las 12 horas mientras que a 4°C podemos conservarlo hasta las 48h. Magistrini y Vidament (1992^b) y Battelier y col. (1998) describieron un método de conservación de semen a 15°C con un diluyente a base de derivados de la leche que conservaba la fertilidad hasta 72 horas. Con cualquier técnica de las anteriores el semen se conserva el tiempo suficiente como para poderlo transportar y enviar donde quiera que se encuentre la yegua (Pickett, 1995). Estudios similares se han realizado en garañones (Ferreira y col., 1991; Mello y col., 2000; Cottorello y col., 2002; Miró y col., 2003^c).

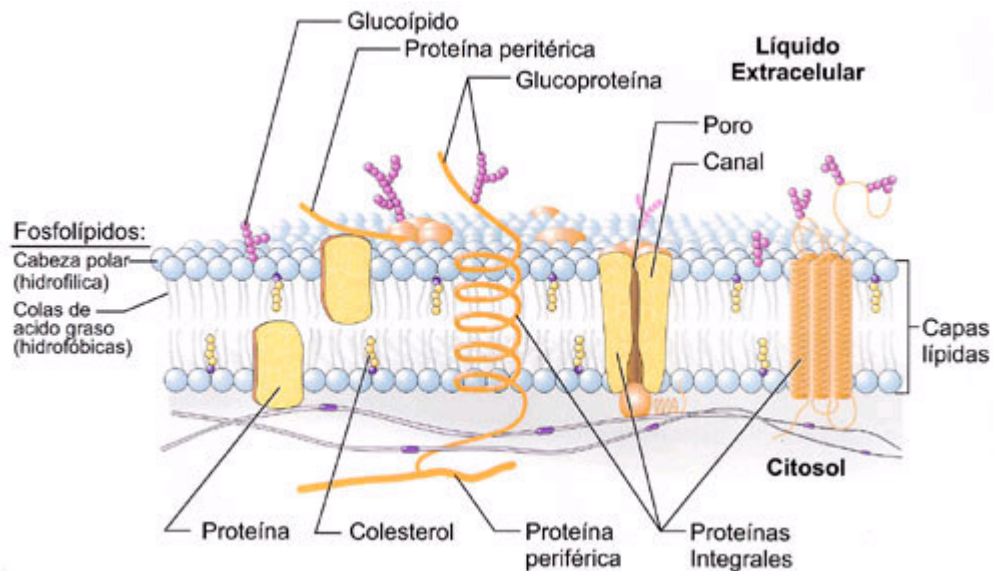
2.5.1.1. Procesamiento del semen refrigerado

La refrigeración del semen disminuye el metabolismo basal de los espermatozoides alargando la vida de éstos, pero por otra parte esta disminución de la temperatura provoca una serie de daños en la célula que se conocen como choque frío o “*cold shock*” (Watson, 1990).

El shock por frío no es un fenómeno específico de los espermatozoides sino de todas las células expuestas al frío. Las membranas celulares están compuestas por una doble capa

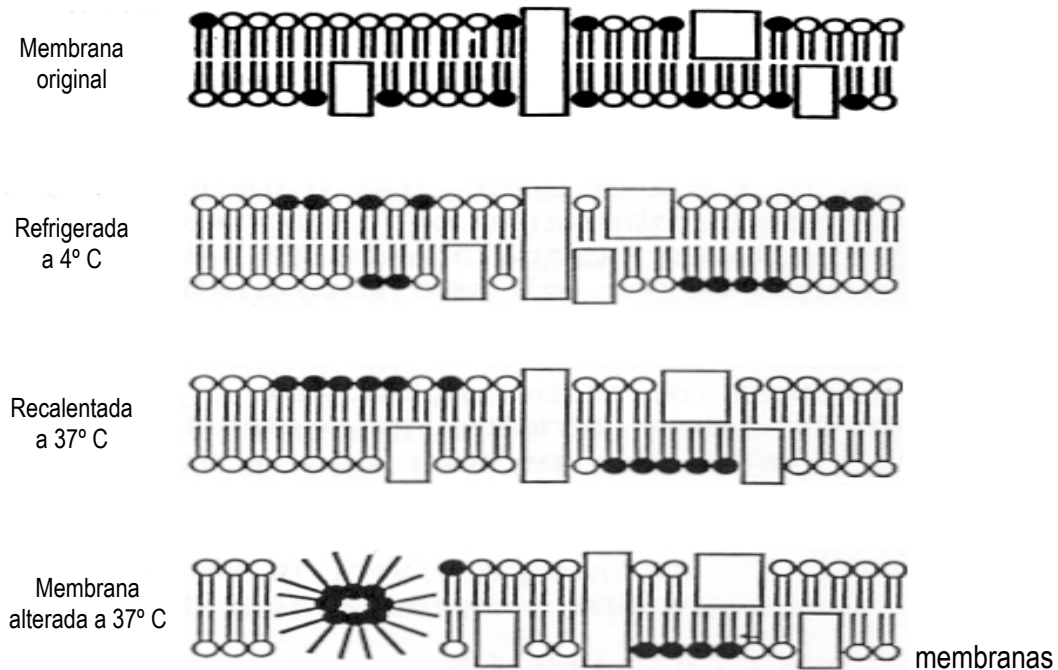
lipídica y proteínas que pueden estar integradas (proteínas integrales) o levemente unidas a la porción externa de la membrana (proteínas periféricas) según el “modelo de mosaico fluido” (Singer y Nicholson, 1972; Langlais y Roberts, 1985).

Fig. 2-5: Estructura de la membrana celular según el “modelo de mosaico fluido”. (Peña y col. 2003)



La membrana del espermatozoide, que es fluida a temperatura corporal, con la exposición al frío sufre cambios estructurales de las moléculas lipídicas (fosfolípidos y colesterol); que van evolucionando según descende la temperatura y pasan de estado líquido a estado cristalino, lo que ocurre en la llamada “fase de transición” (Quinn, 1981); ésto se traduce en una reducción de la capacidad de desplazamiento de estas moléculas, alterándose la fluidez de la membrana que, incluso puede llegar a romperse (Watson, 1990; Pickett y Amann, 1987; Hammerstedt y col., 1990; Drobnis y col., 1993; Amann y Graham, 1993^a).

Fig. 2-6: Estructura de la membrana celular del espermatozoide, alteraciones inducidas por el choque frío
 (Adaptado de *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania)



acrosomal y plasmática, disminuye el metabolismo y se pierden componentes intracelulares y además disminuye el porcentaje de células móviles y el patrón de movimiento se hace irregular (Amann y Pickett, 1987^b; Amann y Graham, 1993^a; Parks y Graham, 1992).

La susceptibilidad a este choque frío es especie-dependiente (Pickett y Komarek, 1966) tanto en el daño que produce, como en la temperatura a la que comienza a producirse (fase de transición); esto se debe a la diferente composición y proporción de los distintos fosfolípidos dentro de las membranas (Amann y Pickett, 1987^b; Drobnis y col., 1993). Las membranas que presentan una relación colesterol/fosfolípidos más alta son más resistentes al frío porque el colesterol actúa como estabilizador (Amann y Pickett, 1987^b; Amann y Graham, 1993^a; Drobnis y col., 1993), por ejemplo los humanos tienen relaciones colesterol/fosfolípidos más altas y una fase de transición menos marcada (Drobnis y col., 1993). La relación colesterol/fosfolípido del espermatozoide equino es de 0.36 y la fase de transición de los lípidos de la membrana del estado líquido a cristalino ocurre a 20.7°C (Amann y Graham, 1993^a).

La refrigeración induce efectos más marcados en la fertilidad que en la motilidad ya que no hay que olvidar que hay otros elementos de la membrana que pueden alterarse con la bajada de temperatura como las proteínas implicadas en el transporte de iones (Amann y Graham, 1993^a). También se producen otros efectos en la célula como la disminución de la capacidad enzimática y de transporte de las proteínas (Amann y Graham, 1993^a) y la pérdida de lípidos (Pickett y Komarek, 1966) y potasio (Drobnis y col., 1993).

Mann y col. (1963) ya vieron que el semen de caballo perdía más rápidamente sus características cuando se conservaba en un diluyente con yema de huevo a 5°C que el semen de burro, que mantenía una motilidad del 60% después de 8 días de almacenamiento, utilizando una velocidad de refrigeración de $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.; Mello y col. (2000) también consiguieron mantener la motilidad progresiva de semen de burro refrigerado en diluyente Baken. Ferreira y col. (1991) comprobaron que la velocidad de refrigeración más adecuada es $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ frente a $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, así como Santos y col. (1995) que concluyeron en su estudio sobre velocidad de refrigeración que el semen de asno resiste mayores velocidades de refrigeración que las comúnmente recomendadas para caballos. Cottorello y col. (2002) en un trabajo de refrigeración de semen de burro usan una velocidad de refrigeración de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, comparan tres temperaturas diferentes, 0°C, 5°C y 10°C, y cuando utiliza diluyentes tipo Baken las temperaturas más bajas (0°C y 5°C) fueron mejores sin prácticamente diferencias estadísticas entre ellas.

2.5.1.1.1. Efecto del plasma seminal

La eliminación del plasma seminal puede minimizar el daño celular y mejorar la fertilidad del semen refrigerado (Pickett y col., 1975^a; Samper, 1997). Algunos autores sugieren que la variabilidad individual en la composición del plasma seminal afecta a la motilidad del semen refrigerado (Brinsko y col., 2000; Dawson, 2000) y recomiendan una mayor dilución del semen para minimizar estos efectos (Varner y col., 1987^a; Jasko y col., 1991) o la centrifugación del semen antes de su refrigeración para incrementar la motilidad del semen refrigerado de aquellos sementales “malos refrigeradores” (Brinsko y col., 2000; Dawson y col., 2000; Keller y col., 2001).

Existen varios estudios sobre la refrigeración del semen de garañón y el efecto del plasma seminal en su longevidad, unos autores evalúan el efecto de la centrifugación del semen en la refrigeración (Ferreira y col., 1991; Miró y col., 2003^c) y otros la refrigeración de la fracción rica en espermatozoides del eyaculado recogida mediante vagina abierta (Mello y col., 2000; Cottorello y col., 2002).

Ferreira y col. (1991) comparan la conservación de semen en un diluyente con yema de huevo y lactosa a 5° C, con o sin plasma seminal, eliminado éste mediante centrifugación, y encontraron mejores resultados de motilidad a las 48 horas de almacenamiento cuando centrifugaba el semen; pero si el diluyente era a base de leche estas diferencias no existieron.

Mello y col. (2000) utilizaron eyaculados completos y eyaculados recogidos con vagina abierta, y dos diluyentes, uno con yema de huevo y otro con leche; no encontrando diferencias significativas en cuanto a la longevidad de estos eyaculados conservados a 5°C durante 11 días en ninguno de los dos diluyentes.

Miró y col. (2003^c) aseguran que el plasma seminal del garañón tiene efectos negativos en la supervivencia de los espermatozoides mantenidos en refrigeración; encontrando mayores índices de supervivencia durante dos días en la conservación del semen de Garañón Catalán en nevera (4°C- 7°C) cuando utilizaban la mayor dilución 1:10 (58-86%) o cuando centrifugaban el semen (59-84%).

2.5.1.1.2. Efecto del diluyente

Para la refrigeración de semen de los équidos se han utilizado muchos tipos de diluyentes, como crema de gelatina (Hughes y Loy, 1970), leche descremada-glucosa (Kenney y col., 1975), CCH-27 (Nishikawa, 1975), yema de huevo-tris-fructosa-glicerol (Guay y col., 1981), INRA 82 y 96 (Magistrini y col., 1992^{ab}; Battelier y col., 1998) o VITAL+20 (Hecht y col., 2001) entre otros. Los diluyentes deben mantener la presión osmótica y el pH estables, aportar nutrientes y una composición mineral adecuada así como sustancias que protejan de la bajada de temperatura (Pickett y col., 1993^a). La leche y la yema de huevo contienen lipoproteínas de baja densidad (fosfolípidos) que poseen la propiedad de estabilizar las membranas celulares (Parks y Graham, 1992; Amann y Graham, 1993^a).

Se han estudiado diversos aditivos tanto para combatir el choque frío como para alargar el tiempo de almacenamiento, entre ellos la lactosa y la rafinosa (Arns y col., 1987), los liposomas de fosfatidilserina y colesterol (Heitland y col., 1995; Kirk y col., 2001), la albúmina sérica bovina (BSA) (Arns y col., 1987; Rigby y col., 2001; Love y col., 2002), los antioxidantes (Aurich y col., 1997) o la teofilina (Heiskanen y col., 1994^{ab}).

En los estudios sobre refrigeración de semen de burro también se utilizan diluyentes con yema de huevo (Mann y col., 1963; Ferreira y col., 1991) o con leche (Santos y col., 1995, Boeta y Zarco-Quintero, 2000; Miró y col., 2003^c).

Mello y col. (2000) emplean dos diluyentes “Kenney” y “Baken 10%” (Baken modificado con 10% de yema de huevo), encontrando diferencias significativas en cuanto a la motilidad total, motilidad progresiva, vigor y morfología espermática, cuando se conservaba a 5°C, resultando mejor el diluyente “Baken 10%”. Cottorello y col. (2002) comparan “Baken” (3% yema de huevo) y “Baken 10%” (con 10% de yema de huevo) y “Kenney”; obteniendo mejores resultados con los diluyentes tipo Baken. Además, encuentran que el “Baken 10%” aporta mayor protección frente al frío, ya que con él no encuentra diferencias significativas en la conservación a 5°C y a 0°C.

Miró y col. (2003^c) mantuvieron el semen de Garañón catalán entre 4° y 7°C durante dos días, usando “Kenney” como diluyente, observando índices de supervivencia espermática superiores al 50% en eyaculados diluidos en distintas proporciones (1:1, 1:5, 1:10) y en eyaculados centrifugados y posteriormente diluidos.

2.5.1.1.4. Efecto de la dilución

La longevidad de los espermatozoides en refrigeración está relacionada con la concentración y el grado de dilución; así el semen muy concentrado debe ser diluido en mayor medida que un semen poco concentrado (Palmer, 1984; Jascko y col., 1992^a; Samper, 2000).

En la mayoría de los artículos publicados sobre refrigeración de semen de asno, éste no se utiliza para inseminar por lo que las diluciones empleadas por los distintos autores seguramente estén calculadas para una mejor observación de la motilidad: Santos y col. (1995) utilizan 25×10^6 esp /ml, Mello y col. (2000) 50×10^6 esp /ml y Cottorello y col. (2002) 100×10^6 esp /ml.

Boeta y Zarco-Quintero en 2000 comparan la fertilidad obtenida con semen refrigerado de burro conservado a 5°C durante menos de 48 horas diluido en leche descremada comercial o en Kenney a una concentración de 40×10^6 esp/ml obteniendo unos resultados de fertilidad del 76.5% y del 54.5% respectivamente.

2.5.1.1.3. Efecto de la temperatura

Se considera generalmente la temperatura de 4 a 6°C como la más adecuada para la conservación de la motilidad (Varner y col., 1988 y 1989; Moran y col. 1992) y de la fertilidad del semen de caballo (Palmer, 1984). En los últimos años investigadores franceses están estudiando la conservación del semen a 15° C, bajo la hipótesis de que a esta temperatura se reducirían los daños en la membrana plasmática de los espermatozoides producidos por el choque frío (Batellier y col., 1998, 2001).

La velocidad de refrigeración es una variable muy importante en la aparición del shock por frío (Kayser y col., 1992; Moran y col., 1992); con el estudio de distintas velocidades de refrigeración del semen de caballo mediante sistemas programables o sistemas pasivos se ha podido comprobar que se obtienen mejores resultados cuando los ritmos de refrigeración son bajos (Province y col., 1985; Kaiser y col., 1992; Douglas-Hamilton y col., 1984; Varner y col., 1988, 1989), obteniendo mejores resultados a velocidades menores de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Varner y col., 1988; Douglas-Hamilton y col., 1984). Con un sistema de refrigeración pasiva como el Equitainer[®], se obtiene una velocidad de refrigeración entre $-0.06^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $-0.01^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Amann y col., 1992).

Ferreira y col. (1991) para conservar semen de garañón a 5°C comprueban que la velocidad de refrigeración más adecuada, empleando un diluyente con yema de huevo, es $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ frente a $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Santos y col. (1995) realizan un trabajo sobre refrigeración de semen de garañón en el que mantiene el semen a 4°C en diluyente Kenney, comparando sistemas de refrigeración activos y pasivos y distintas velocidades de refrigeración; concluyen estos autores que el semen de garañón soporta mayores velocidades de refrigeración (-0.6°C y -1.0°C) que los caballos y no encuentran diferencias entre el uso de un sistema de refrigeración activo y otro pasivo. Trimeche (1996^a) utiliza una velocidad muy parecida (-0.5°C) en la refrigeración del semen de asno del Poitou para su posterior congelación y Mello y col. (2000) utilizan este protocolo (-0.6°C de velocidad de refrigeración y 5°C de temperatura de conservación) para estudiar el efecto del plasma seminal en la conservación del semen.

Cottorello y col. (2002) en un trabajo en el que emplearon una velocidad de refrigeración de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y tres temperaturas diferentes de almacenamiento, 0°C , 5°C y 10°C , encontraron diferencias significativas en la calidad seminal a los 10°C siendo ésta la peor temperatura de conservación con diluyentes tipo Baken pero no cuando utilizaron diluyente Kenney.

2.5.1.1.5. Efecto del tiempo de conservación

El tiempo de conservación afecta a la motilidad (Province y col., 1985) y a la fertilidad del semen refrigerado (Pickett y Amann, 1987; Franci y Amann, 1987; Varner y col. 1989); el semen de caballo conservado a 4°C mantiene unos buenos índices de motilidad y fertilidad durante las primeras 48 horas, y Batellier y col. (1998, 2001) obtuvieron buenos índices de fertilidad tras inseminar con semen mantenido a 15°C durante 24 ó 72 horas en un medio definido.

Kreuchauf (1983) obtiene motilidades del 58% y 37% tras la conservación del semen de asno a 5°C durante 24 y 48 horas respectivamente y Santos y col. (1995) consiguieron una motilidad progresiva mayor al 40% tras 48 horas de almacenamiento a 4°C en medio Kenney, fuese cual fuese la velocidad de refrigeración, y superior al 30% tras 72 h cuando la velocidad usada era -0.6 ó -1.0°C/min.

Cottorello y col. (2002), sin embargo, no encuentran buena actividad espermática tras 48 horas en ninguna de las temperaturas utilizadas (0° C, 5° C, 10° C) para la refrigeración de semen de asno en medio Kenney, el mismo diluyente empleado por Santos y col. (1995); pero sí utilizando Baken modificado (Baken 10%) o Baken tradicional, con una motilidad tras 48 horas del 60% y 30% respectivamente; y a las 72 horas el Baken 10% mantiene porcentajes por encima del 50% cuando la temperatura de refrigeración es de 0° C ó 5°C.

Mello y col. (2000), para estudiar el efecto del plasma seminal en la conservación a 5°C del semen de asno, utilizan dos diluyentes Kenney y Baken 10%, obteniendo una motilidad progresiva superior al 30% hasta el 4° día en medio Kenney y hasta el día 8° en medio Baken 10%.

Miró y col. (2003^c) mantuvieron índices de supervivencia espermática superiores al 58% tras 48 horas de conservación a 4°C de semen de Garañón Catalán cuando la dilución en medio Kenney era 1:10 ó cuando se centrifugaba.

2.5.1.2. Fertilidad del semen refrigerado

La refrigeración de semen a 4°C durante periodos de 24 a 48 horas se emplea rutinariamente en la cría equina con buenos resultados (Jasko y col., 1992^a; Pickett y col., 1993^a; Pickett, 1995; Heiskanen y col., 1994^a; Samper, 1997; Batellier y col., 2001).

Aunque varios estudios evalúan la motilidad del semen de asno tras periodos de refrigeración más o menos largos, existen pocos datos respecto a la fertilidad obtenida con este semen. Ferreira y Henry (1992) obtienen una fertilidad en el primer celo del 76% en 29 yeguas utilizando semen de garañón, conservando en un medio con yema de huevo a 5°C durante 48 horas, inseminando las yeguas en días alternos con 250×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva en cada dosis.

Boeta y Zarco-Quintero (2000) comparan el uso de semen de burro diluido en leche descremada comercial o en Kenney y conservado a 5°C durante menos de 48 horas, obteniendo unos resultados de fertilidad en 28 yeguas del 76,5% y 54,5% respectivamente.

2.5.2. Congelación de semen

La congelación de semen permite el almacenamiento de forma indefinida de material genético (Amann y Pickett, 1987^b; Hammerstedt y col., 1990, Samper y Morris, 1998) que puede ser empleado posteriormente dentro de los planes de recuperación de una raza (Holt y Pickard, 1999).

La escasa bibliografía sobre congelación de semen de asno obliga a los investigadores a utilizar la información existente referente a los caballos. En algunos trabajos publicados sobre congelación de semen de burro se consiguen mantener unas buenas características espermáticas postdescongelación (Kreuchauf, 1983; Trimechey col., 1996^b, 1997^{ab}, 1998; Silva y col., 1997; Miró y col., 2003^d) y con buenos niveles de fertilidad cuando se inseminan yeguas o ponys (Glatzel y col., 1981 citado por Clément, 2001^b; Trimeche, 1996^a; Vidament, 2001-citada

por Clément, 2001^b); pero con resultados de fertilidad muy pobres cuando se inseminan burras (Trimeche y col., 1996^a, 1998; Vidament, 2001-citada por Clément, 2001^b).

Trimeche (1996^a) desarrolló un sistema de congelación de semen de burro con el que consiguió mantener unas buenas características espermáticas en los análisis postdescongelación, pero con el que obtuvo bajos índices de fertilidad; de 21 burras se quedaron preñadas 8 y de esas 8 sólo nacieron tres buches; además posteriores intentos de reproducir esos resultados han tenido peores resultados, consiguiendo sólo un 8% de fertilidad. (Vidament, 2001 citada por Clément, 2001^b).

2.5.2.1. Criobiología espermática

El desarrollo de un buen protocolo de congelación-descongelación de los espermatozoides persigue mantener las funciones espermáticas tras la descongelación: la motilidad, el metabolismo para la producción energética y la integridad de las membranas acrosomal y plasmática necesarias para la penetración y fusión con el óvulo en la fecundación. La pérdida de una sola de estas características podría reducir o suprimir totalmente la fertilidad del espermatozoide (Amann y Pickett, 1987^b).

Las principales alteraciones que pueden producirse en los espermatozoides durante la congelación y descongelación de la célula, y que pueden dañar sus funciones, proceden de cambios en la membrana derivados del propio enfriamiento, la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, la deshidratación celular y el aumento de la concentración de solutos y las alteraciones morfológicas de la membrana plasmática que ocurren durante los procesos de deshidratación y rehidratación (Amann y Pickett, 1987^b).

2.5.2.1.1. Congelación

A la temperatura de 0°C la formación de hielo no ha comenzado; esto se debe a que el punto de congelación del medio intra y extracelular se sitúa por debajo de esta temperatura. La formación de cristales de hielo puro en el medio extracelular produce un aumento de la presión osmótica que provoca la salida del agua del interior de la célula a través de la membrana plasmática con la consiguiente deshidratación celular (Amann y Pickett, 1987^b; Graham, 1996^c), estos cambios ocurren en la célula entre -15°C y -60°C (Parks y Graham, 1992).

Para Hammerstedt y col. (1990) la deshidratación celular produce un aumento en la permeabilidad no selectiva de la célula debido a los cambios en la distribución de algunos componentes de la membrana celular, como los lípidos que se redistribuyen formando asociaciones de baja estabilidad, y la formación de pliegues en la membrana de la célula para ajustar su volumen a los cambios producidos por la deshidratación, y como consecuencia puede provocar la fusión entre membranas contiguas debidas al contacto entre ellas; si además la proporción entre canales de solución no congelada y células no es la suficiente las células se deformarán y se dañarán (Parks y Graham, 1992). Por otro lado el aumento de la concentración de solutos intra y extracelulares puede ser tóxico para la célula (Graham, 1996^c). Todas estas alteraciones dañan en mayor o menor medida a los espermatozoides, de hecho las células descongeladas son más lábiles que las células no procesadas y la longevidad de la motilidad es inferior en las células descongeladas (Parrish y Foote, 1986, Graham y Foote, 1987; Parks y Graham, 1992).

El desarrollo de estos procesos varía según el ritmo de enfriamiento (Mazur, 1963).

Ritmo lento: permite una deshidratación progresiva provocando una concentración intracelular de solutos tal que no se formen cristales intracelulares, el medio extracelular se congela quedando las células atrapadas en canales de solución sin congelar (Parks y Graham, 1992); si permanece sin congelar el 15% del agua extracelular, los niveles de supervivencia espermática son muy altos (Amann y Pickett, 1987^b).

Ritmo rápido: Si el ritmo de congelación es rápido no hay tiempo suficiente para la deshidratación celular quedando agua en el interior de la célula que se congela en forma de microcristales, los cuales no dañan la célula (Graham, 1996^c).

Ritmo intermedio: el hielo intracelular tendrá forma de grandes cristales que producen lesiones y muerte celular (Amann y Pickett, 1987^b; Parks y Graham, 1992).

2.5.2.1.2. Descongelación

El proceso de descongelación es crucial para la supervivencia espermática. Cuando la congelación de las células es lenta la descongelación debe ser lenta también permitiendo el paso del agua a través de la membrana y la rehidratación celular, si el ritmo de descongelación es demasiado rápido el movimiento de agua al interior de la célula será mayor al paso de solutos produciendo un aumento excesivo de volumen que será lesivo para el espermatozoide (Hammerstedt y col., 1990; Graham, 1996^c).

Si el proceso de congelación ha sido muy rápido el proceso de descongelación debe ser de la misma manera para que los microcristales de hielo se fundan rápidamente; si el ritmo de descongelación es menor se podría producir la recristalización de los microcristales intracelulares provocando formación de cristales grandes que lesionarían las organelas celulares; (Graham, 1996^c).

2.5.2.1.3. Crioprotectores

La congelación de las células requiere el uso de unas sustancias crioprotectoras que disminuyan los efectos generados por el paso del agua de fase líquida a fase sólida y viceversa durante los procesos de congelación/descongelación.

Hammerstedt y col. (1990) clasifican a los crioprotectores según su capacidad de penetrar las células como crioprotectores internos o externos. Los crioprotectores externos

(lactosa, manosa, trehalosa) ejercen su acción crioprotectora en el medio externo, aumentando el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas y disminuyendo la concentración de sales en los canales de agua (Amann y Pickett, 1987^b), algunos (sucrosa, trehalosa) son capaces además de estabilizar también las membranas durante los procesos de congelación (Anchordoguy y col., 1987). Los crioprotectores internos, como el dimetilsulfóxido y el glicerol, son capaces de penetrar al interior del citoplasma, reemplazar el agua intracelular y disminuir el estrés osmótico producido por la deshidratación, manteniendo el volumen y disminuyendo el punto de congelación. El DMSO permite que las membranas se fundan (alrededor de 0°C), previniendo la difusión de los cationes y componentes citoplásmicos a través de los poros de las membranas formados por los cristales del hielo (Shier, 1988). El glicerol mantiene la integridad de las proteínas previniendo la desnaturalización de las membranas (Baust, 1973).

La yema de huevo y los fosfolípidos de bajo peso molecular contenidos en la leche parece que ejercen su acción crioprotectora sustituyendo o minimizando la pérdida de lípidos (Parks y Graham, 1992; Graham y Foote, 1987; Heitland y col., 1995) que ocurre durante los procesos de refrigeración y congelación (Pickett y Komarek, 1966).

El glicerol es el crioprotector más empleado en la congelación del semen equino y aunque puede penetrar en la célula actúa también en el medio externo, aumentando la osmolalidad y favoreciendo así la deshidratación celular. El glicerol 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 (Amann y Pickett, 1987^b). Actúa también sobre los componentes de la membrana formando uniones entre las proteínas, disminuyendo su fluidez (Parks y Graham, 1992) e induciendo mayores necesidades energéticas (Hammerstedt y col, 1990)

El paso del glicerol a través de la membrana es de 30 a 60 veces más lento que el del agua esto provoca grandes movimientos de agua a la vez que cambios de volumen en la célula. (Hammerstedt y col., 1990; Parks y Graham, 1992; Graham, 1996^c). Un contenido de glicerol 1M en una suspensión de espermatozoides provoca tal flujo de agua intracelular hacia el medio

externo que disminuye el volumen celular en un 50%, pero cuando el glicerol lentamente entra en la célula este flujo se invierte, hasta que la célula llega al “tiempo de equilibración” donde recobra su volumen normal; deshidratándose de nuevo según avanza el proceso de congelación por el aumento de la concentración de solutos en los canales de agua sin congelar.

Estos cambios son aún más marcados en la descongelación; al descongelarse se produce un rápido influjo de agua al interior de la célula porque decrece la concentración de solutos en el medio externo, el espermatozoide sufre un aumento de volumen de más del doble antes de que el glicerol salga lentamente y el equilibrio osmótico se restablezca (Hammerstedt y col., 1990; Graham, 1996^c). Las membranas de la pieza intermedia y del flagelo responden a estos cambios alterando su forma, pasando la pieza intermedia de cilindro a esfera y la cabeza de aplanada a esférica (Hammerstedt y col., 1990).

La eficacia de los crioprotectores esta también determinada por los efectos tóxicos de estos agentes (Fahy, 1986); por ello la cantidad de crioprotector que se debe emplear es la mínima necesaria para optimizar las posibilidades de supervivencia de las células (Amann y Pickett, 1987^b; Graham, 1996^c). Vidament y col. (2001) estudiando varias proporciones de glicerol (entre 1.5 - 4.5%) encontraron un aumento visible, aunque no significativo, en la motilidad del semen descongelado cuando utilizaban concentraciones entre 2.4 y 2.8% de glicerol.

Se han empleado otros crioprotectores menos tóxicos y de menor peso molecular para la congelación de semen de caballo, entre otros dimetil-sulfoxido (DMSO), etilenglicol, propandiol, eritritol y amidas (Amann y Pickett, 1987^b; Alvarenga y col., 2000^{ab}; Graham, 2000^{ab}; Henry y col., 2002; Vidament y col. 2002). El DMSO permite que las membranas se fundan (alrededor de 0°C), previniendo la difusión de los cationes y componentes citoplásmicos a través de los poros de las membranas formados por los cristales del hielo (Shier, 1988).

Los primeros datos sobre fertilidad de semen equino congelado con otros crioprotectores como el etilenglicol son antiguos (Kotlagima 1963 y Rombe, 1965 citados por Alvarenga y col., 2000^{ab}) e indican una fertilidad de entre el 60% y el 80%. Alvarenga y col. (2000^a) usando una

concentración del 5% de etilenglicol observan que los espermatozoides mantenían las mismas características cinéticas e integridad del acrosoma que con glicerol. Henry y col. (2002) llegaron a la misma conclusión empleando etilenglicol así como con una mezcla de acetamida, trehalosa y metilcelulosa.

La dimetilformamida mantiene por lo menos las mismas características “*in vitro*” de los espermatozoides congelados-descongelados que el glicerol (Alvarenga y col., 2000^b; Graham y col., 2000^b). Medeiros y col. (2002) en un estudio con dimetilformamida, metilformamida, dimetilacetamida y glicerol apreciaron ventajas al usar la dimetilformamida sola o en combinación con el glicerol frente al uso del glicerol como único crioprotector. Gomes y col. (2002) emplean estos mismos crioprotectores en semen de caballo de raza Mangalarga Marchador obteniendo mejores resultados con dimetilformamida que con el glicerol y Vidament y col. (2002) no encontraron diferencias ni en la motilidad ni en la fertilidad entre el semen congelado con glicerol o con un 2% de dimetilformamida, lo que confirmaría que estos crioprotectores son una alternativa eficaz al uso del glicerol.

Los trabajos publicados sobre congelación de semen de burro utilizan siempre glicerol como crioprotector principal (Silva y col., 1997; Trimeche, 1996^a, Miró y col., 2003^d). No tenemos conocimiento de ningún trabajo sobre congelación de semen de burro que intente sustituir el glicerol por otros crioprotectores menos tóxicos.

2.5.2.2. Procesado del semen

Existe una falta total de estandarización en los protocolos de congelación e inseminación entre los distintos laboratorios dedicados a la congelación de semen equino (Graham, 1996^c; Samper y Morris, 1998; Samper 2000). La congelación del semen equino requiere un procesado que incluye:

2.5.2.2.1. Dilución y centrifugación

El alto volumen y baja concentración del semen equino hace imprescindible la centrifugación del eyaculado completo o la recogida de la fracción rica de espermatozoides utilizando una vagina abierta; así reducimos el volumen del eyaculado, eliminamos la fracción del plasma seminal y aumentamos su concentración para posteriormente diluirlo a una concentración determinada y en el medio adecuado para la congelación (Graham, 1996^c).

La centrifugación no es una técnica inocua (Cochran y col., 1983, 1984; Cristanelli y col., 1984; Blach y col., 1989; Jasko y col., 1991; Anderka y Plante, 1995), y numerosos estudios han intentado establecer las condiciones de centrifugación que disminuyeran los daños producidos en el espermatozoide de caballo (Amann y Picket, 1987^b; Martin y col., 1979; Heitland y col. 1996).

Los diluyentes empleados para la centrifugación también han sido variados: Glucosa-EDTA (Martin y col., 1979); citrato-EDTA con un gradiente de densidad de glucosa-EDTA (Cochran y col., 1984); gradiente de Percoll (Anderka y Plante, 1995); medio con leche y yema de huevo (Magistrini y Vidament, 1992; Vidament y col., 2001) o HBS (Heitland y col., 1996).

Varios laboratorios recogen sólo la fracción rica en espermatozoides del eyaculado (Merkt y col., 1975; Müller, 1987); sin embargo algunos autores obtienen peores resultados cuando la comparan con la recogida completa y posterior centrifugación del eyaculado (Vidament y col., 2001). Blach y col. (1989) evaluaron los cambios producidos en la membrana acrosomal y las características cinéticas de los espermatozoides en las distintas fases de la congelación encontrando que los procesos de congelación y descongelación provocaron daños mucho más marcados que la centrifugación.

En los trabajos publicados sobre congelación de semen de burro, Silva y col. (1997) diluyen el semen en glucosa-EDTA y lo centrifugan a 600g durante 10 minutos obteniendo una motilidad mayor al 30% postdescongelación. Sin embargo, Trimeche (1996^a) obtiene malos

resultados en la congelación de semen de burro cuando centrifuga el semen refrigerándolo previamente, para Miró y col (2003^d) estos resultados se deben a que no utiliza centrifuga refrigerada; en el último experimento de la tesis doctoral de Trimeche (1996^a) compara la congelación de la primera fracción del eyaculado recogido con una vagina abierta y la congelación de esa fracción reconstituida con el resto del eyaculado, indicando mejoras en algunas características cinéticas (motilidad, VCL y ALH) cuando utiliza sólo la primera fracción.

Miró y col. (2003^d) utilizan en sus trabajos preliminares sobre congelación de semen de garañón Catalán el diluyente Kenney en proporción 1:4 para centrifugarlo a una velocidad 661g durante 15 minutos.

2.5.2.2.2. Diluyente de congelación

Previamente a la congelación el pelet o la porción del semen rica en espermatozoides se deben diluir en un diluyente de congelación que contenga crioprotectores, ajustando la concentración final según el número de espermatozoides necesarios en las dosis seminales.

El primer diluyente descrito con el que se consiguió el nacimiento de un potro vivo era leche entera con un 10% de glicerol (Barker y Gandier, 1957). Actualmente la mayoría de los diluyentes de congelación empleados contienen una mezcla de sales minerales, azúcares, EDTA, yema de huevo y/o leche desnatada, además del glicerol.

El diluyente Martin ó Lactosa-EDTA (Martin y col., 1979) ha sido la base de la mayoría de los diluyentes empleados en la congelación de semen de caballo; en la encuesta realizado por Samper y Morris (1998) trece de veintiuno de los laboratorios encuestados emplean rutinariamente este diluyente.

Un autor chino (He, 1986-citado por Amann y Pickett, 1987^b) describe un diluyente que consiste en una solución de sacarosa al 11 % con yema de huevo, leche desnatada y un 5% de glicerol; derivado de éste el diluyente de Burns y Reasner (1995) emplea una mezcla muy rica en

glucosa y sacarosa, leche desnatada y yema de huevo; posteriormente Ecot y col. (2000) observan buenas motilidades postdescongelación en un diluyente similar, consistente en glucosa, bicarbonato, leche desnatada, 4% de yema de huevo y 2.5% de glicerol.

Los franceses emplean un diluyente (INRA 82) compuesto de un 50% de una solución con azúcares (glucosa, lactosa y rafinosa) y sales minerales (citrato sódico y citrato potásico), un 50% de leche desnatada; un 2% de yema de huevo y un 2.5% de glicerol (Palmer, 1984). Heitland y col. lo modificaron añadiendo un tampón (HEPES), un 4% de yema de huevo y un 4% de glicerol y lo denominó SM-EY (Heitland y col., 1995, 1996; Leipold y col., 1998); este medio fue superior al Lactosa-EDTA según el estudio publicado por Heitland y col. en 1996.

Silva y col. (1997) en un trabajo de congelación de semen de burro donde estudian el efecto del sistema de envasado utilizan el diluyente Lactosa-EDTA de Martin (1979) obteniendo motilidades aceptables por encima del 30%.

La tesis de Trimeche (1996^a) evalúa los efectos crioprotectores de distintas sustancias en la congelación de semen de burro de la Raza Poitou, en la primera experiencia determinó la concentración de glicerol (4%) (Trimeche y col. 1997^b); en la segunda experiencia evalúa si la adición de fructosa al diluyente aumenta la calidad “*in vitro*” del semen congelado-descongelado, basándose en un estudio propio que demostraba que el plasma seminal del asno del Poitou tiene más concentración en fructosa que el del caballo (Trimeche y col. 1997^a). En otro experimento comprobó el efecto causado por la adición de glutamina al medio de congelación, encontrando que suplementando el medio con 80mM de glutamina incrementaba el porcentaje y las características de la motilidad (Trimeche y col. 1996^b), pero con este protocolo de congelación no consiguió ninguna gestación en varias pruebas de inseminación con burras y una muy baja fertilidad en yeguas y hembras ponies; finalmente mejoró los parámetros de motilidad al añadir un 10% de yema de huevo de codorniz a su diluyente de congelación (Trimeche y col. 1997^c); como conclusión de estos trabajos desarrolla el diluyente T2-94, basado en el INRA 82 (Palmer, 1984), suplementado con 80mM de glutamina, 10% de yema de codorniz y con un 4% de glicerol. En las pruebas realizadas *in vivo* con el T2-94 se obtuvieron nacimientos de buches

vivos cuando la concentración de glicerol era disminuida mediante dilución tras la descongelación (Trimeche y col., 1996^a, 1998); con este mismo diluyente, Vidament (citada por Clément, 2001^b) en trabajos posteriores ha conseguido sólo un 8% de fertilidad.

Tabla 2-7: Diluyente T2-94 (Trimeche, 1996^a)

Componentes	Cantidad	Componentes	Cantidad
Leche desnatada	1 litro	Glicerol	4%
Glucosa	126,2 mM	Gentamicina	100 mg
Lactosa	4,2 mM	Penicilina	83,3 mg
Rafinosa	2,5 mM	Agua destilada	1 litro
Citrato de sodio	1,0 mM	L-glutamina	80 mM
Citrato de potasio	1,3 mM	Yema de huevo de codorniz	12%
pH 6,8 Osm (sin glicerol) 375 mOsm/Kg			

Miró y col. (2003^d) utilizan para la congelación de semen de garañón Catalán el diluyente comercial de equinos GENT[®], obteniendo una viabilidad espermática postdescongelación del 24% al 60%, dependiente del garañón utilizado.

2.5.2.2.3. Refrigeración y equilibración

El tiempo transcurrido desde la suspensión de las células en el diluyente de congelación hasta el momento de la congelación se sitúa en unos 30 minutos (Martin y col., 1979; Cochran y col., 1984). Para algunos autores este tiempo no produce ningún efecto en la motilidad postdescongelación del semen, aunque el semen se congele directamente desde los 20°C, se refrigere a 5°C en presencia de glicerol o se refrigere a 5°C añadiendo el glicerol a esta temperatura (Cochran y col., 1984; Braun y col., 1994), esto podría deberse a que el efecto crioprotector ejercido por el glicerol es básicamente extracelular (Rajamannau y col., 1968; citado por Amann y Pickett, 1987^b).

Algunos diluyentes como el Lactosa-EDTA no necesitan una refrigeración del semen antes de la congelación (Graham, 1996^c; Heitland y col., 1996); sin embargo, el método francés de congelación INRA 82 (Magistrini y Vidament, 1992^b) contempla la dilución del semen, su refrigeración a 4°C durante una hora, centrifugación y finalmente la resuspensión en el medio de congelación con glicerol, equilibrándose en esta solución a 4°C durante 30 a 45 minutos antes de ser congelado. Vidament y col. (2001) con este mismo método obtiene buenos resultados de fertilidad en caballos, sea el semen refrigerado a 4°C antes o después de la centrifugación.

Heitland y col. (1996) congelaron semen en lactosa-EDTA-yema o SM-EY tras un periodo de refrigeración de 0, 2.5 ó 5 horas; el tiempo de refrigeración no tuvo ningún efecto en las características cinéticas del semen congelado en lactosa-EDTA-yema, mientras que la refrigeración durante 2.5 ó 5 horas aportó mejoras en la cinética de los espermatozoides en el diluyente SM-EY; encontraron por tanto que existe una interacción entre el tiempo de refrigeración y el diluyente empleado en la congelación del semen.

En los estudios de congelación de semen de burro también hay variaciones entre los diferentes autores; Silva y col. (1997) utilizan el diluyente Lactosa-EDTA que no precisa de refrigeración previa para obtener buenos resultados, sin embargo Trimeche (1996^a) al utilizar un diluyente basado en el INRA 82 francés refrigera en un sistema programable hasta 4°C a una velocidad de -0,5°C/min. Miró y col. (2003^d) utilizan GENT[®] refrigerando el semen en medio GENT-A[®] hasta 5°C y después añaden medio GENT-congelación[®] en la misma proporción que GENT-A[®] para posteriormente envasarlo y congelarlo.

2.5.2.2.4. Envasado

Los primeros sistemas de envasado usados en la congelación de semen equino fueron viales de vidrio (Amann y Pickett, 1987^b), pastillas (Merkt y col., 1975; Martin y col., 1979) o tubos de aluminio (Tischner, 1979; Müller, 1987); aunque en la actualidad se envasa en pajuelas, bien sean macro o micropajuelas. La micropajuela o pajuela francesa tiene una capacidad de 0.5

ml (Loomis y col., 1983) y aporta mayor velocidad y uniformidad en la congelación (Graham, 1996^c; Alvarenga y col., 2000^a).

Heitland y col. (1996) encontraron mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y mayor velocidad curvilínea cuando el semen fue diluido en SM-EY y empaquetado en pajuelas francesas frente a pajuelas de 2.5 ml; sin embargo, no observaron diferencias entre los sistemas de empajuelado cuando el semen fue diluido en lactosa-EDTA. Crockett y col. (2001) no encontraron diferencias en los análisis postdescongelación cuando realizaban el envasado en pajuelas de 0.5 ó 2.5 ml en tres diluyentes diferentes; como tampoco Samper (1995) que comparó pajuelas de 0.5, 2.5 y 5 ml. Recientemente Dell'aqua y col. (2001) han introducido el uso de pajuelas de 0.25 ml y han comparado su uso frente a pajuelas de 4 y 0.5 ml; encontrando que la motilidad progresiva, la vitalidad y el test hiposmótico eran mejores en este formato.

Para algunos autores (Heitland y col., 1996; Crockett y col., 2001) concentraciones muy elevadas son perjudiciales para la calidad postdescongelación del semen, en contra Leipold y col. (1998) no observaron diferencias en la motilidad del semen congelado a una concentración de 400×10^6 ó 1600×10^6 spz/ml, e incluso la fertilidad del semen congelado a la mayor concentración tendió a ser superior; y Jasko y col. (1992^c) obtuvieron un índice de recuperación de embriones el día siete postovulación del 56% utilizando una sola pajuela de 0.5 ml con 800 millones de espermatozoides.

Silva y col. (1997) estudian dos sistemas de envasado del semen de garañón para su congelación, macrotubos con una capacidad de 4ml y tubos de aluminio con una capacidad de 10 ml, no encontrando diferencias significativas entre los dos sistemas de envasado en cuanto a la motilidad, formas anormales o a la integridad del acrosoma.

Miró y col. (2003^d) al igual que Trimeche en su tesis doctoral (1996^a) utilizan pajuelas de 0.5 ml para los distintos experimentos sobre congelación de semen del burro de raza Catalana y Poitou respectivamente.

2.5.2.2.5. Congelación y almacenamiento

En caballos se han empleado distintos protocolos de congelación, Cristanelli y col. (1984) utilizan un sistema programable con el que obtienen una bajada de temperatura de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde temperatura ambiente hasta -15°C y $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -15°C hasta -120°C y posteriormente introducen las pajuelas en nitrógeno líquido. La mayoría de laboratorios equipados con congeladores programables usan un ritmo de congelación de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 20°C y -15°C y una segunda velocidad variable de $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ó $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -15 y -120°C (Cristanelli y col., 1985; Blach y col., 1989; Magistrini y Vidament, 1992^a; Borg y col., 1997; Samper y Morris, 1998).

Cuando la congelación se realiza sobre vapores de nitrógeno líquido el ritmo de congelación es variable según la altura a la que se coloquen las pajuelas sobre la superficie del nitrógeno líquido, siendo una velocidad generalmente alta de alrededor de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Distintos trabajos han comparado el uso de estos dos métodos de congelación sin encontrar diferencias entre ellos. (Cochran y col., 1984; Cristanelli y col., 1985; Heitland y col., 1996).

En los trabajos publicados sobre congelación de semen de burro se utiliza congelación sobre vapores de nitrógeno líquido (Trimeche, 1996^a; Silva y col., 1997; Miró y col., 2003^d).

La evaluación del semen congelado se puede realizar independientemente del tiempo que lleve almacenado en nitrógeno líquido (Nishikawa, 1975; Lomis y col, 1983; Cristanelli y col., 1985; Blach y col., 1989; Heitland y col., 1996), tampoco cambia su capacidad fecundante esté almacenado días o años (Merkt y col., 1975; Nishikawa, 1975).

2.5.2.3.6. Descongelación del semen

El sistema de envasado y la velocidad de congelación nos va ha determinar el protocolo de descongelación (Samper, 2000). El semen envasado en macropajuelas de 5 ó 2.5 ml es descongelado mediante inmersión en agua a 50°C durante 45 segundos (Martin y col., 1979;

Heitland y col., 1996; Samper y Morris, 1998). El semen envasado en pajuelas de 0.5 ml es descongelado mediante inmersión en un baño maría a 37°C durante 30 segundos (Loomis y col., 1983) o a 75°C durante 7 segundos (Cochran y col., 1984). Cochran y col. (1984) encontraron mayor motilidad en el semen descongelado a 75°C, mientras que Borg y col. (1997) encontraron mayor porcentaje de espermatozoide vivos descongelando el semen a 37°C.

Tabla 2-8: Diferentes protocolos de descongelación de semen de caballo según tipo de envasado (Samper, 2000)

Envasado	Descongelación	Tiempo
Una pajuela de 0.5ml	75° C	7 segundos
Varias pajuelas de 0.5 ml	37° C	Al menos 30 segundos
Pajuelas de 2.5 ml	50° C	45 segundos
Pajuelas de 4.0 ml	50° C	45 segundos
Pajuelas de 5.0 ml	50° C	45 segundos
Pastillas o pellet 0.1 ml	37 ° C	Al menos 15 segundos
Bolsas de polietileno	20° C	30 segundos

Trimeche (1996^a) para la congelación de semen de burro del Poitou utiliza siempre pajuelas de 0.5 ml y la descongelación la lleva a cabo mediante inmersión en agua atemperada a 37°C durante 30 segundos.

Silva y col. (1997) comparan dos sistemas de envasado en la congelación de semen de burro, macrotubos y tubos de aluminio de 10 ml, descongelándolo a 50°C durante 45 segundos para los macrotubos y 45°C durante 60 segundos para los tubos de aluminio.

2.3.2.5. Fertilidad del semen congelado

El primer potro nacido mediante la técnica de inseminación artificial con semen congelado fue descrito en 1957 (Barker y Gandier, 1957). El semen equino congelado-descongelado mediante las diferentes metodologías descritas pierde en gran parte su capacidad fecundante, el porcentaje de fertilidad de las yeguas inseminadas con semen equino descongelado no supera el 50% según diferentes autores (Klug y col., 1975; Merkt y col., 1975; Nishikawa 1975; Pace and Sullivan 1975; Loomis y col., 1983, 2001; Cochran y col., 1983; Cristanelli y col., 1984; Volkmann y Van Zyl, 1987; Samper y col., 1991, 2001, 2002; Jasko y col., 1992^c; Wilhelm y col., 1996; Vidament y col., 1997, 2000^b; Barbacini y col. 1999).

La variabilidad de los resultados entre los distintos autores puede ser debida a la diferencia entre sementales, a la época del año o a la falta de estandarización sobre los protocolos de congelación y descongelación, así como la dosis y el protocolo de inseminación (Amann y Pickett, 1987^b; Pickett y col., 1993^b; Sanz y col., 1999; Samper, 2000). Hay otros factores involucrados en la efectividad del semen congelado: el técnico que realiza la inseminación (Thompson y Evans, 1992; Müller, 1987), el estado o la edad de la yegua (Vidament y col., 1997; Graham, 1996^c; Samper 2000) o la época de las inseminaciones (Vidament y col., 1997).

En asnos Miró (2003^d) encuentra grandes diferencias entre individuos en la capacidad de congelación del semen en el garañón Catalán, en su experiencia la viabilidad espermática postdescongelación varía entre un 24% y un 60% dependiendo del individuo.

Los resultados de fertilidad cuando se utiliza semen congelado de burro para la producción mular son inferiores a los conseguidos con semen equino; Glatzel (1981) citado por Thompson y Evans (1992) tan sólo consiguió un 20% de fertilidad con semen congelado frente a un 63% de fertilidad con semen fresco; y Kadir (1983) entre el 7.08% y el 39.5%.

Trimeche (1996^a) insemina las burras cada 24 horas desde que observa un folículo de más de 30 mm hasta la ovulación, en todos los experimentos de fertilidad con semen congelado de asno del Poitou. Realiza un estudio de inseminación de burras en el que emplea dosis de 240×10^6 , 400×10^6 ó 600×10^6 espermatozoides totales, consiguiendo una gestación (1/149 ciclos) con la dosis de inseminación de 400×10^6 espermatozoides que se perdió antes del día 22 y en sus siguientes experimentos utiliza una dosis de 600×10^6 espermatozoides.

Trimeche (1996^a) realiza un estudio comparativo de fertilidad del semen de Poitou fresco y congelado realizado sobre yeguas, ponis y burras; en este experimento utiliza una dosis de 400×10^6 espermatozoides por dosis de semen fresco y 600×10^6 espermatozoides por dosis de semen congelado; en este trabajo la diferencia de fertilidad cuando insemina yeguas con semen fresco (54%) o con semen congelado (23%) es evidente, al igual que cuando insemina ponis (84% frente al 16%), pero los peores resultados se consiguen con la inseminación de las burras ya que no alcanza ninguna gestación con semen congelado frente a un 29% con semen fresco.

Tabla 2-9: Fertilidad del semen congelado-descongelado del semen de burro del Poitou (Trimeche, 1996^a)

	Semen fresco	Semen congelado
Yeguas (n=13)	54%	23%
Ponis (n=6)	84%	16%
Burras (n=7)	29%	0%
Total (n=26)	54%	15%*

*P<0,005

Este mismo autor (en el mismo trabajo) comprobó que la adición de glutamina al medio de congelación incrementaba el porcentaje y las características de la motilidad y también observó un aumento de la motilidad y de sus características al añadir 10% de yema de huevo de codorniz a su diluyente de congelación. Por último con el diluyente T2-94 desarrollado tras esta serie de experimentos realiza una prueba de inseminación con semen congelado en burras en el

que no obtiene ninguna gestación en 17 ciclos utilizados; pero cuando disminuyó la concentración de glicerol mediante la dilución del semen descongelado obtiene 8 gestaciones de 21 ciclos, de los cuales nacieron 3 buches (38.09% fertilidad). Cuando otros autores han repitieron este protocolo de inseminación artificial sólo obtuvieron una fertilidad del 8% (Vidament, 2001 citada por Clément, 2001^b).



MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos planteados llevamos a cabo este estudio en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal.

3.1. Diseño experimental

3.1.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa

En este primer estudio evaluamos las características seminales del asno zamorano-leonés de manera que podamos establecer los parámetros de normalidad dentro de la raza.

Utilizamos siete burros de dicha raza, de probada fertilidad, con una edad comprendida entre los 3 y los 15 años, estabulados en la Facultad de Veterinaria de Madrid durante el año 2001. Establecimos una pauta de recogida de semen de tres veces en semana, utilizando para ello una vagina artificial modelo Missouri y como estímulo sexual una yegua o una burra en celo, con lo que obtuvimos un total de 38 eyaculados. En cada uno determinamos los siguientes parámetros:

- pH del eyaculado (pH)
- Volumen del eyaculado (V_o)
- Concentración espermática (C)
- Porcentaje de espermatozoides con motilidad total y progresiva (MT) (MP)
- Porcentaje de espermatozoides con morfología normal (N)
- Número total de espermatozoides en el eyaculado (NT)
- Número de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado (NTMP)
- Número de espermatozoides con motilidad progresiva y morfológicamente normales por eyaculado (NTMPN)
- Porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra (HOS)
- Porcentaje de espermatozoides con la membrana acrosomal íntegra (A)

Analizamos los datos por medio de un análisis factorial de la varianza usando modelo lineal general, las diferencias significativas las evaluamos usando test de Student-Newman-Keuls.

3.1.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa.

Realizamos este estudio con el fin de establecer las condiciones de recogida y manipulación que permitan la máxima supervivencia de los espermatozoides de asno para su almacenamiento.

Utilizamos eyaculados procedentes de los siete burros zamorano-leoneses empleados en la experiencia anterior y obtenidos a lo largo de todo el año según ya describimos. Obtuvimos seis eyaculados de cada individuo, tres con vagina cerrada y tres mediante vagina abierta.

Procesamos cada eyaculado individualmente, evaluando:

-Efecto del plasma seminal

Los eyaculados recogidos con vagina artificial abierta (VA) y por tanto pobres en plasma seminal, los diluimos y refrigeramos directamente.

Los eyaculados recogidos con vagina artificial cerrada (VC) los dividimos en dos alícuotas, una la diluimos y centrifugamos a 400g durante 7 min con el fin de eliminar todo el plasma seminal, eliminamos el sobrenadante mediante aspiración y el pellet lo rediluímos para su posterior refrigeración; la otra (control) la diluimos directamente.

-Efecto del diluyente

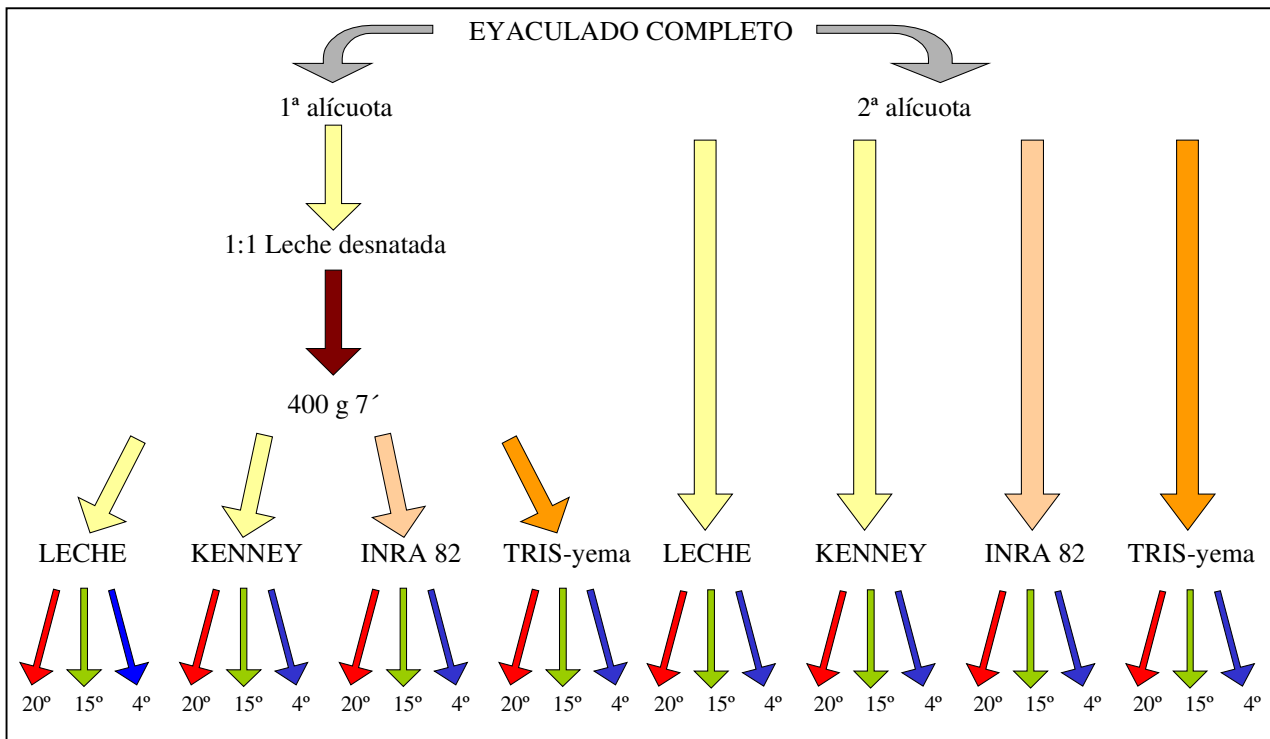
Cada una de las tres muestras anteriores las dividimos en cuatro alícuotas y las diluimos a una concentración de 50×10^6 espermatozoides por mililitro en cada uno de los cuatro diluyentes en estudio (Leche, Kenney, INRA 82, TRIS-yema).

-Efecto de la temperatura de conservación

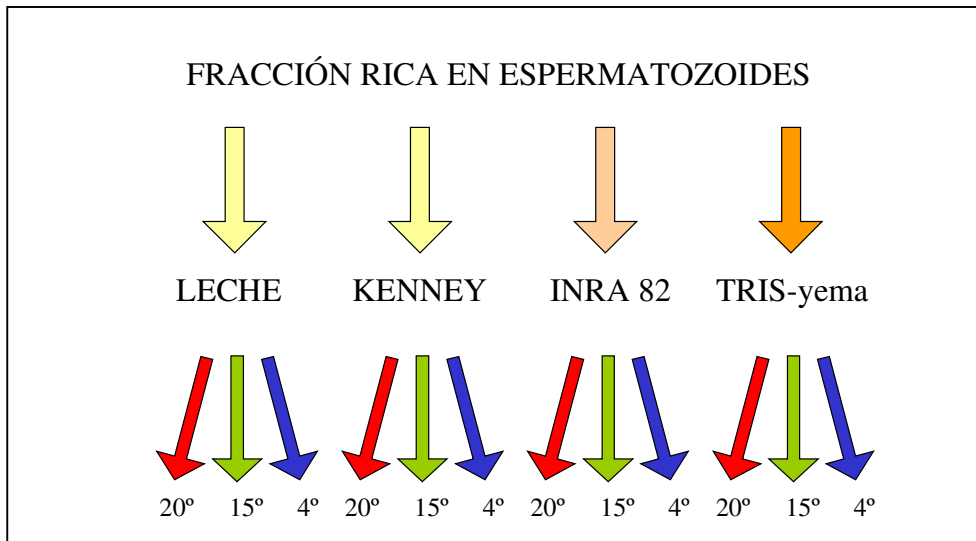
Las doce alícuotas anteriores las dividimos en tres y las conservamos a temperatura ambiente 20°C, 15°C y 4°C.

Los siguientes esquemas ilustran el proceso que hemos seguido:

Esquema 3-1: Eyaculados recogidos con vagina cerrada



Esquema 3-2: Eyaculados recogidos con vagina abierta



Evaluamos las muestras cada 12 horas determinando el porcentaje de espermatozoides con motilidad total (MT), el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (MP), y el porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática mediante test hiposmótico (HOS). Cuando la MP de una muestra disminuyó por debajo del 30% suspendimos la incubación.

Analizamos los datos mediante análisis de varianza univariante; las diferencias significativas las evaluamos usando test de Duncan.

3.1.3. Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa.

Hemos realizado este estudio con el fin de establecer una técnica de crioconservación de semen de asno que permitan la máxima supervivencia de los espermatozoides de asno tras su congelación y almacenamiento.

Para ello utilizamos seis de los siete burros anteriores, a cada uno de los cuales recogimos tres eyaculados completos mediante vagina artificial cerrada, en total procesamos 18 eyaculados.

Estudiamos dos diluyentes, así como dos tipos y dos concentraciones de crioprotectores:

-Efecto del diluyente

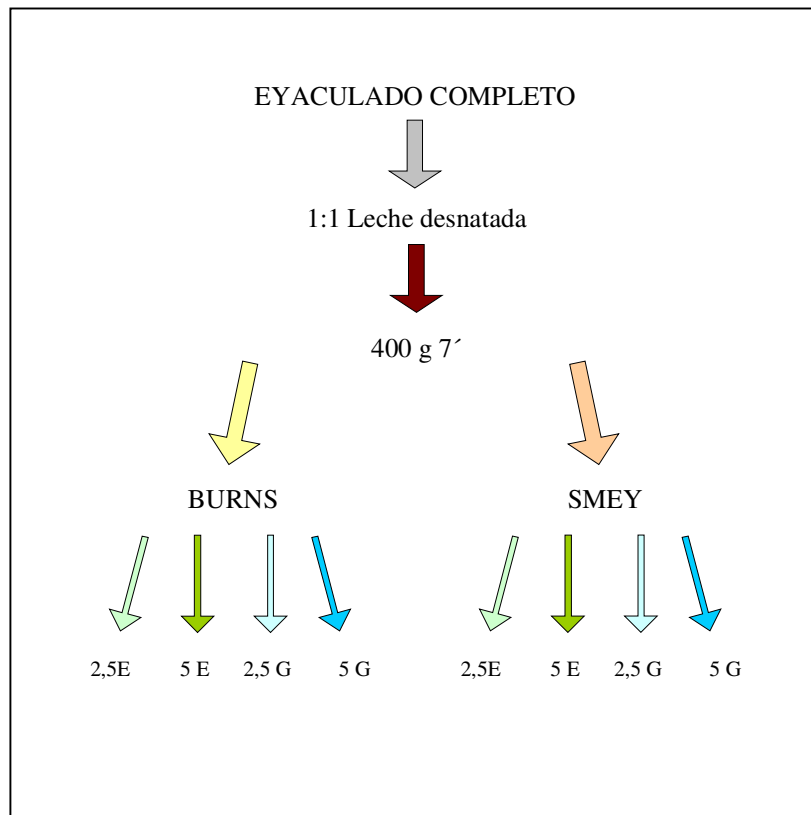
Para la congelación de cada eyaculado usamos dos diluyentes diferentes BURNS (Tabla 3-7) y SMEY (Tabla 3-8).

-Efecto del tipo y concentración de crioprotector

Estudiamos el uso de dos crioprotectores: etilenglicol y glicerol; cada uno de ellos a dos concentraciones distintas (2.5% etilenglicol, 5% etilenglicol, 2.5% glicerol, 5% glicerol).

Los eyaculados se procesaron según queda expresado en el Esquema 3-3. Previamente cada eyaculado se diluyó en leche desnatada, se centrifugó con el fin de eliminar el plasma seminal y se dividió en ocho alícuotas, cada una de las cuales fue rediluida a la concentración de 50×10^6 esp/ml en medio BURNS o SMEY con los crioprotectores previamente descritos. Las muestras fueron empajueladas, congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido hasta su posterior evaluación.

Esquema 3-3: Congelación del semen



Las muestras descongeladas fueron incubadas en un baño maría a 37°C durante 1 hora y en todas ellas se hicieron los siguientes análisis: en el momento de la descongelación (0h) y tras una hora de incubación a 37°C (1h):

- Características de la motilidad determinadas mediante análisis computerizado(CASA).
- Integridad de la membrana plasmática determinada mediante test hiposmótico (HOS).
- Integridad de la membrana acrosomal y vitalidad determinadas mediante citometría de flujo (CF).

Analizamos los datos mediante análisis de varianza univariante; las diferencias significativas las evaluamos usando test de Duncan.

3.2 Animales

Utilizamos siete garañones de raza Zamorano-Leonesa procedentes tres de ellos de ganaderos particulares y cuatro del Depósito de Sementales de León. Para la recolección de semen empleamos tres hembras, una yegua cruzada de 17 años de edad y dos burras una de 7 años de edad y otra de 14.

Los animales fueron alojados en boxes individuales de 3×3 en el Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid, bajo un régimen alimenticio normal con avena, paja, alfalfa y agua a libre disposición.

3.3 Medios y soluciones

En este apartado exponemos todos aquellos medios y soluciones que hemos preparado en nuestro laboratorio, sus componentes, las proporciones así como su conservación hasta su uso.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos empleados fueron de la marca Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Los medios se prepararon con agua destilada (destilador Elix de Millipore), añadiendo los componentes según se especifica a continuación. Los medios que contenían huevo se clarificaron mediante centrifugación a 2000 g (EBA-12R - Hettich) durante 20 minutos, empleándose sólo el sobrenadante. Se midió la osmolaridad (osmómetro 3 MO-The Advances, Massachuset, USA) ajustándola a lo que se especifica en cada uno de ellos, el pH se determinó mediante pHmetro Micro Ph (Crison) a temperatura ambiente. En los casos de los medios con leche o huevo el pH se determinó mediante tiras (Merck 6.5-10.0). Salvo que se indique lo contrario los medios tras su preparación se dividieron en alícuotas y se mantuvieron en congelación a -20°C descongelándose el mismo día de su uso. Se empleó un solo lote de medio por experimento.

3.3.1. Medios para el análisis de integridad de la membrana plasmática.

Solución hiposmótica (Trimeche y col., 1996^a, 1998)

Se empleó para realizar el test hiposmótico (HOS) que evalúa la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Tabla 3-1: Solución HOS

Componentes	Cantidad
Citrato de sodio	0,735 mg
Fructosa	1,351 mg
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm 150 mOsm/Kg

Formol-citrato

Utilizamos esta solución como fijador para detener el test hiposmótico, así como para el recuento de espermatozoides en cámara de Neubauer y para la evaluación de formas anormales de los espermatozoides. Lo conservamos a temperatura ambiente.

Tabla3-2: Formol-citrato

Componentes	Cantidad
Citrato sódico	3.4 g
Formol	0,5 ml
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	

3.3.2. Medios para la refrigeración del semen

Leche descremada

Utilizamos este medio para la refrigeración del semen, así como para la dilución del semen en la estimación subjetiva de la motilidad espermática y como medio de centrifugación.

Tabla 3-3: Leche descremada

Componentes	Cantidad
Leche descremada en polvo	10 g
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm 310 mOsm /Kg

Kenney (Kenney y col., 1975)

Tabla 3-4: Kenney

Componentes	Cantidad
Leche descremada	2,4 g
Glucosa	4,9 g
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm 360 mOsm/Kg

INRA 82 (Palmer, 1984)**Tabla 3-5: INRA 82**

Componentes	Cantidad
Leche desnatada	50 g
Agua destilada	500 -ml
Glucosa	25 g
Lactosa 1 hidrato	1,5 g
Rafinosa 5 hidrato	1,5 g
Citrato de sodio 2 hidrato	0,25 g
Citrato de potasio 1 hidrato	0,41 g
Hepes	4,76 g
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	500 ml
pH 7,9	Osm 332 mOsm/Kg

TRIS-yema (Graham, J.K y Foote, R.H., 1987)**Tabla 3-6: TRIS-yema**

Componentes	Cantidad
Tris (121)	2,42 g
Acido cítrico (210,1)	1,36 g
Glucosa (180)	1 g
Yema de huevo	20 ml
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm 317 mOsm/Kg

3.3.3 Medios de congelación

BURNS (Burns y Reasner, 1995)

Tabla 3-7: BURNS

Componentes	Cantidad
Sacarosa	7g
Glucosa	0,9g
Leche descremada	2,5g
Yema de huevo	4 ml
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm 360 mOsm/Kg

SMEY (Heitland y col., 1996)

Tabla 3-8 : SMEY

Componentes	Cantidad
Leche desnatada	55,75 g
Glucosa	27,64 g
Citrato de sodio 2 hidrato	0,30 g
Lactosa 1 hidrato	1,5 g
Rafinosa 5 hidrato	1,5 g
Citrato de potasio 1 hidrato	0,42 g
Hepes	7,14 g
Yema de huevo	40 ml
Penicilina	100000 U.I.
Agua destilada	1000 ml
pH 7,9	Osm 332 mOsm/Kg

3.3.4. Medios para la citometría de flujo

PBS

Utilizado para diluir PI, PSA y el semen en el análisis mediante citometría de flujo.

Tabla 3-9: PBS

Componentes	Cantidad
Fosfato potásico	0,027 g
Fosfato disódico	0.11 g
Cloruro sódico	0.87 g
Agua destilada	100 ml
pH 7,9	Osm

PI (Ioduro de propidio)

Utilizado para evaluar la vitalidad de los espermatozoides descongelados. Ioduro de propidio (PI, P4170, Sigma). Conservamos en refrigeración.

Tabla 3-10: PI

Componentes	Cantidad
PI	0,125mg
PBS	1 ml

PSA (Lectina de Pisum Sativum)

Utilizado para evaluar la integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides descongelados. (FITC-PSA, Sigma). Conservamos en refrigeración.

Tabla 3-11: PSA

Componentes	Cantidad
PSA	1mg
PBS	1ml

3.4 Recolección de semen

Empleamos como estímulo sexual una yegua o una burra a las cuales administramos estrógenos (Estrógeno E-Neosan®) vía intramuscular una vez a la semana durante todo el tiempo que duró este estudio, a la hora de la recogida las inmovilizamos mediante trabones para evitar accidentes.

Establecimos una pauta de recogida de tres veces en semana. Con los garañones usamos un bozal para evitar lesiones en las hembras, manejados por un ayudante permitimos el libre cortejo que éstos necesitan para presentar erección, momento en el que se les permite la monta de las hembras. Una vez montado sobre la hembra, el encargado de la recogida desvió lateralmente el pene facilitando su introducción en la vagina artificial, sujetando ésta firmemente contra la grupa de la hembra, hasta la eyaculación. Permitimos un tiempo de reacción máximo de 1 hora antes de considerar fallida una recolección.

3.4.1. Recolección de semen con vagina cerrada

Utilizamos una vagina artificial modelo Missouri o vagina cerrada (VC) a la cual adaptamos una bolsa de plástico como colector. Una vez detectada la eyaculación por palpación uretral inclinamos la vagina suavemente para permitir que el eyaculado llegase al colector, consiguiendo una muestra completa del eyaculado, que se trasladó inmediatamente al laboratorio para su evaluación y procesado.

3.4.2. Recolección de semen con vagina abierta

Modificamos la vagina artificial tipo Missouri eliminándole el cono final, de tal manera que el glande del garañón sobresale en el momento de la recogida, como colector usamos un embudo grande con una bolsa de plástico en su extremo, sujeto por un ayudante que recolectó sólo las tres primeras fracciones del eyaculado que son más ricas en espermatozoides y contiene por tanto menos plasma seminal.

3.5 Contratación seminal

Inmediatamente tras la recogida llevamos el semen al laboratorio, eliminamos el gel mediante filtración y evaluamos los siguientes parámetros:

3.5.1. Volumen (Vo)

Medimos el volumen libre de gel mediante probeta graduada.

3.5.2. Concentración (C)

Para determinar el número de espermatozoides por mililitro usamos un espectofotómetro (Spermacue®, Minitüb) previamente calibrado con una cámara de Neubauer. En las experiencias que se centrifugó el semen, la concentración de espermatozoides en el pellet se determinó con cámara de Neubauer, para lo cual el semen puro lo diluímos 1:200 en formal citrato (Tabla 3-2) e hicimos el recuento del número de espermatozoides bajo un microscopio de contraste de fases (Olympus BX50).

3.5.3. PH (pH)

Mediante las tiras de pH (Merck 6,5-10,0).

3.5.4. Número total de espermatozoides por eyaculado (NT)

Obtuvimos este dato multiplicando el Volumen por la Concentración.

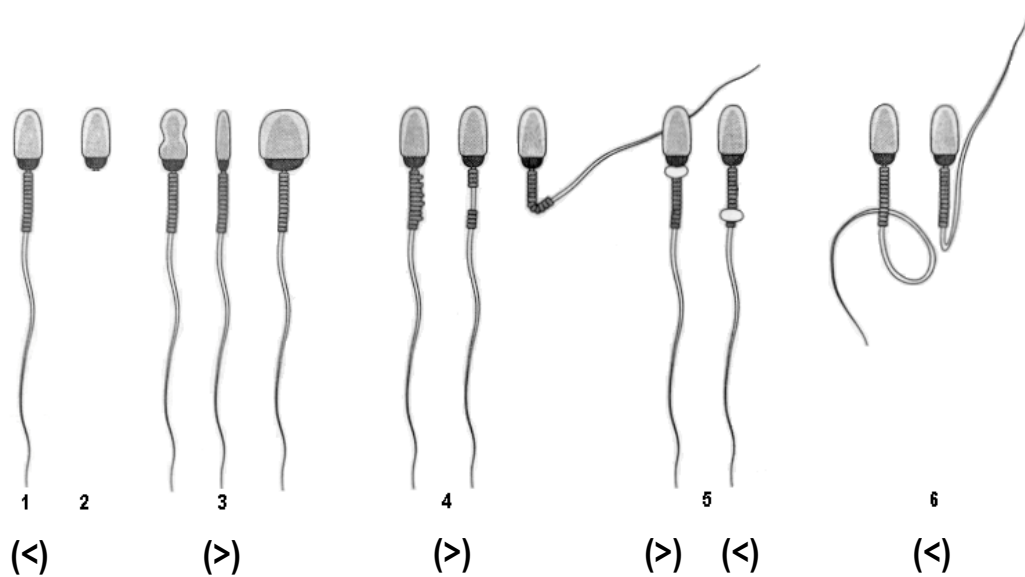
3.5.5. Estimación subjetiva de la motilidad espermática

Diluímos una muestra de semen en leche desnatada (Tabla 3-3) a 38°C a una concentración de 50 millones de espermatozoides por mililitro; se colocó una muestra de 5 µl de la dilución entre portarobjetos y cubre (18x18mm) precalentados en placa calefactora (Minitüb HT200) a 38°C y un único observador evaluó tanto la motilidad total (MT) como la motilidad progresiva (MP) bajo un microscopio óptico (Olimpus CH20).

3.5.6. Porcentaje de espermatozoides con morfología normal (N)

Diluímos un mililitro de semen en un mililitro de Formol-citrato (Tabla 3-2) y evaluamos bajo contraste de fases 100 células que clasificamos según Jasko y col. (1990^a) en las siguientes categorías: Normal (N), cabezas sueltas (Cs), cabezas anormales (Ca), pieza intermedia anormal (Pi), gota citoplasmática proximal (Gp), gota citoplasmática distal (Gd), cola anormal (Cl); agrupándolas además en morfoanomalías mayores (>) (Ca+Pi+Gp) y menores (<) (Cs+Gd+Cl). Expresamos el resultado en porcentaje.

Fig 3-1: Morfoanomalías espermáticas: (1) Normal (2) Cabezas sueltas (3) Cabezas anormales (4) Pieza intermedia anormal (5a) Gota citoplasmática proximal (5b) Gota citoplasmática distal (6) Cola anormal (>) Morfoanomalía mayor (<) Morfoanomalía menor (Modificado de Blanchard y Varner, 1996)



3.5.7. Porcentaje de espermatozoides con integridad de la membrana plasmática (HOS)

Evaluamos el porcentaje de espermatozoides cuya membrana plasmática se encuentra intacta mediante el test hiposmótico (Tabla 3-1) descrito por Trimeche (1996^a), para su realización mezclamos 100 µl de muestra seminal con 1 ml de la solución hiposmótica (150mOsm), dejamos incubar al baño maría a 37°C durante 1 hora, en ese momento añadimos 500 µl de formol citrato (Tabla 3-2) para fijar las células y evaluamos 100 células bajo microscopio de contraste de fases, considerando como positivos aquellos espermatozoides que han permitido el paso del agua a través de su membrana y por tanto han modificado su forma. En la Fig 3-2 se observan las distintas morfologías adoptadas por las células.

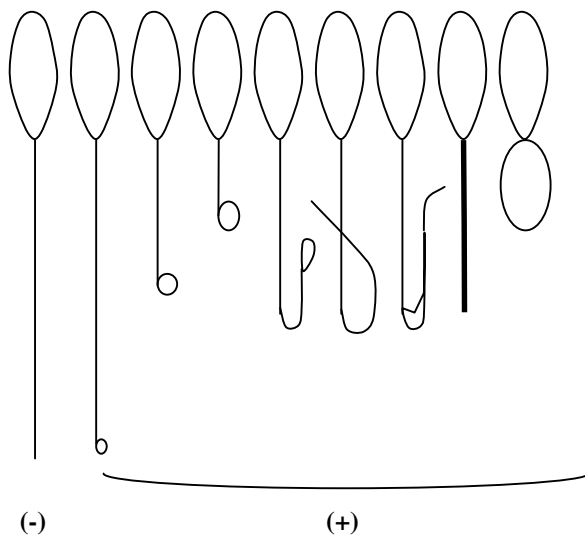


Fig. 3-2: Test hiposmótico: Negativo (-); Positivos (+)
(adaptado de Nield y col., 1999)



Foto 3-1: Test hiposmótico

3.5.8. Número de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado (NTMP)

Multiplicamos el número total de espermatozoides por eyaculado por el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, según muestra la siguiente fórmula.

$$\text{NTMP} = \text{NT} \times \text{MP} / 100$$

3.5.9. Número de espermatozoides con motilidad progresiva y morfología normal por eyaculado (NTMPN)

Multiplicamos el número total de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado por el porcentaje de espermatozoides con morfología normal, según muestra la siguiente fórmula.

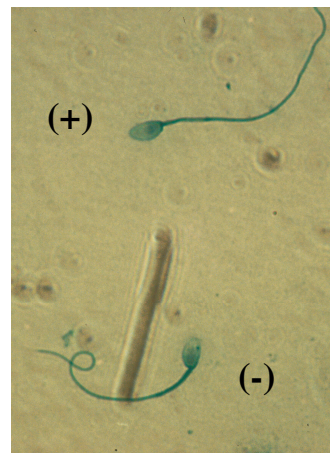
$$\text{NTMPN} = \text{NTMP} \times \text{N} / 100$$

3.5.10. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (A)

Usamos la tinción Spermac® (Oettle, 1986) con la que el acrosoma intacto se observa teñido de verde en el extremo apical. Evaluamos bajo contraste de fases (200x) 100 células, expresamos el resultado en porcentaje.

Foto 3-2: Tinción de Spermac.

(+) acrosoma íntegro
(-) acrosoma dañado



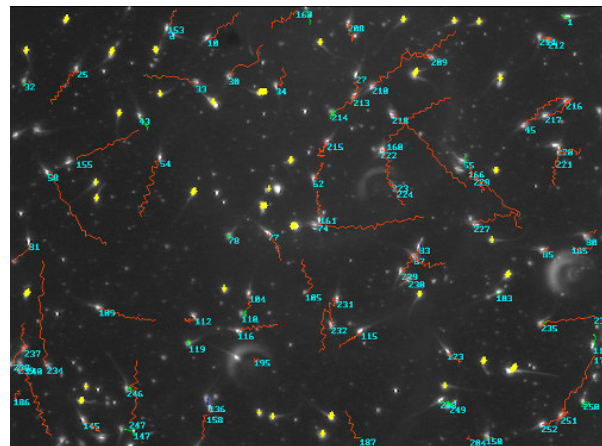
3.5.11 Análisis computerizado de la motilidad (CASA)

Colocamos una muestra de 7,5 μ l de semen entre porta y cubre (22x22 mm) previamente atemperados, una vez que el campo se mantuvo estable se capturaron cuatro campos que se analizaron por medio del sistema computerizado de análisis de la motilidad Sperm Class Analyzer (Microptic S.L). Para mantener constantes las condiciones del análisis utilizamos para todos ellos las siguientes variables.

Tabla 3-12: Variables utilizadas para el análisis computerizado de la motilidad

Temperatura	38°
Profundidad de campo	15 μ
Nº de imágenes	25
Tamaño mín	10 μ^2
Progresivos	>60% STR
Conectividad	12
Nº min para calcular ALH	10

Foto 3-3: Imagen obtenida con el sistema CASA



Se recogieron y evaluaron los siguientes datos:

-Velocidad curvilínea (VCL): la media de la velocidad del recorrido de los espermatozoides desde el punto actual al punto real siguiente. (μ m/s).

-Velocidad promedio (VAP): velocidad del recorrido promedio realizado por el espermatozoide (μ m/s).

-Velocidad rectilínea (VSL): velocidad del recorrido medido en línea recta desde el punto inicial al punto final (μ m/s).

-Índice de rectitud (STR): estima la proximidad del recorrido del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VAP (%).

-Índice de linealidad (LIN): estima la proximidad de la trayectoria real del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VCL (%).

-Motiles totales (MT): Porcentaje de espermatozoides con motilidad (%).

-Motiles progresivos (MP): Porcentaje de espermatozoides con STR >60% (%).

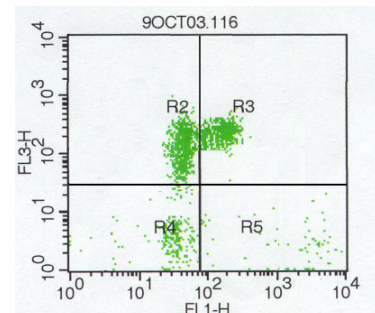
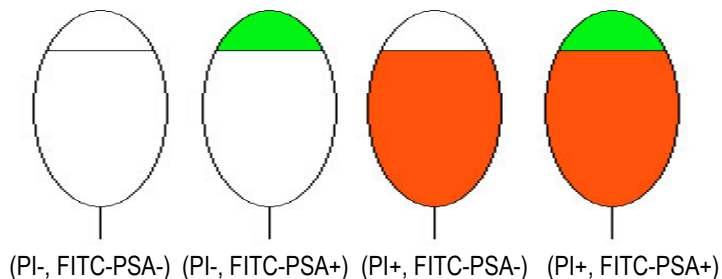
3.5.12. Evaluación de la vitalidad e integridad de la membrana acrosomal mediante citometría de flujo (CF)

Estudiamos el porcentaje de espermatozoides vivos y con la membrana acrosomal íntegra, mediante citometría de flujo. Procesamos las muestras según la técnica de Wilhelm y col. (1996), para ello procedimos de la siguiente manera: tomamos una alícuota de 200 μ de semen descongelado a la que se le añaden 2.5 μ de PI (0.125 mg/ml) y 10 μ de FITC-PSA (1 mg/ml), incubamos 5 min a temperatura ambiente, posteriormente recogimos 20 μ del semen teñido, lo que correspondería a un millón de espermatozoides y lo diluimos en 1 ml de PBS, posteriormente lo filtramos a través de un filtro de 34 μ y lo analizamos mediante citometría de flujo (FACScan, Becton-Dickinson, San José, CA).

El uso combinado de PI y FITC-PSA permite clasificar los espermatozoides en cuatro categorías (Foto 3-4):

- Espermatozoide vivo, con acrosoma intacto (PI-, FITC-PSA-): no presenta coloración bajo microscopía de fluorescencia. (R4)
- Espermatozoide vivo con acrosoma dañado (PI-, FITC-PSA+): acrosoma teñido de **verde**. (R5)
- Espermatozoide muerto con acrosoma intacto (PI+, FITC-PSA-): cabeza teñida de **rojo**. (R2)
- Espermatozoide muerto con acrosoma dañado (PI+, FITC-PSA+): cabeza teñida de **rojo** y acrosoma teñido de **verde**. (R3)

Fig 3-3. Representación de la tinción espermática con PI-FITC-PSA Foto 3-4: Imagen obtenida con citometría de flujo



3.6 Procesado del semen

3.6.1 Centrifugación del semen

Para su centrifugación diluimos el semen 1:1 con leche desnatada, centrifugamos a 400 g durante 7 min en una Centrifuga EBA 12 (Hettich), eliminamos el sobrenadante mediante aspiración y resuspendimos el pellet calculando la concentración de espermatozoides mediante cámara de Neubauer, cuando fue necesario, rediluyendo las muestras en los medios indicados en cada experiencia y a la concentración deseada.

3.6.2 Refrigeración del semen

Introducimos las muestras en un recipiente con 100 ml de agua destilada a 38°C. Las temperaturas de conservación fueron 20°C (temperatura ambiente), 15°C y 4°C. Las muestras refrigeradas a 15°C y 4°C se mantuvieron 15 minutos a temperatura ambiente y después fueron introducidas en sendas estufas a 15°C y 4°C. La bajada de temperatura fue de $-0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, las muestras necesitaron 40 minutos y 2 horas para alcanzar 15°C y 4°C respectivamente. Las muestras control (20°C) se mantuvieron a temperatura ambiente durante todo el experimento.

3.6.3 Congelación del semen

Tras la centrifugación, redilución y refrigeración a 4°C, empaquetamos en pajuelas de 0,5 ml y congelamos en vapores de nitrógeno líquido, manteniendo las pajuelas en posición horizontal sobre una raqueta de congelación a unos 2.5 cm de distancia de la superficie del nitrógeno líquido durante 5 minutos y a continuación las sumergimos en el nitrógeno. Almacenamos las pajuelas en tanques de nitrógeno líquido hasta su descongelación y análisis.

3.6.4. Descongelación

Llevamos a cabo la descongelación de las muestras mediante inmersión en baño maría a 37°C durante 30 segundos.

3.7. Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos utilizamos el programa SPSS 11.0



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa.

Para esta experiencia se procesaron 38 eyaculados procedentes de siete burros. En ninguno de los eyaculados se obtuvo gel; pudiendo observar los promedios para cada variable estudiada en la siguiente tabla:

Tabla 4.1-1: Valores promedio del análisis seminal del burro de raza Zamorano-Leonesa.

PARÁMETRO	MEDIA	RANGO
Vo (ml)	64,87 ±4,62	20-140
Cc (10 ⁶ esp/ml)	274,66 ±12,73	140-547
PH	7,68 ±0,02	7,4-8
MT %	85,13 ±0,89	70-90
MP %	74,47 ±0,96	60-80
HOS %	64,34 ±2,44	31-93
A %	82,68 ±1,84	60-98
N %	86,61 ±1,26	64-99
NT (10 ⁶ esp/ml)	17304,61 ±1401,93	3920-48720
NTMP (10 ⁶ esp/ml)	12769,24 ±988,66	2744-34104
NTMPN (10 ⁶ esp/ml)	10926,34 ±792,61	2469-25578

Media (Media ± error típico de la media)

Vo: volumen (fracción libre de gel); **Cc:** concentración; **PH:** pH; **MT:** motilidad total; **MP:** motilidad progresiva; **N:** espermatozoides morfológicamente normales; **A:** acrosomas normales; **HOS:** positivos al test hiposmótico; **NT:** número total de espermatozoides en el eyauido; **NTMP:** número total de espermatozoides en el eyauido con motilidad progresiva; **NTMPN:** número total de espermatozoides en el eyauido con motilidad progresiva y morfológicamente normales.

Mediante un análisis de la varianza univariante y la prueba post hoc (Student-Newman-Keuls), estudiamos las diferencias entre individuos para cada uno de los parámetros (Sig. < 0,05). Los resultados se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 4.1-2: Valores promedio por individuo del análisis seminal del burro de raza Zamorano-Leonesa.

IND	Vo (ml)	Cc (10 ⁶ esp/ml)	PH	MT %	MP %	N %	A %	HOS %	NT (10 ⁶ esp/ml)	NTMP (10 ⁶ esp/ml)	NTMPN (10 ⁶ esp/ml)
Gerineldo	57,7±9,3 ^a	245,7±22,0 ^a	7,75±0,02 ^a	81,1±2,0 ^{a,b}	71,7±2,0 ^{a,b}	80,7±1,9 ^{a,b}	77,2±4,2 ^a	58,2±6,4 ^a	12940,9±1533,7 ^{a,b}	9132,1±1017,3 ^a	7361,3±846,6 ^a
Igloo	69,6±8,0 ^a	221,9±32,3 ^a	7,76±0,05 ^a	87,8±1,5 ^{a,b}	76,7±1,7 ^{a,b}	90,3±3,0 ^a	78,27±2,9 ^a	78±3,4 ^a	14547,1±2290,2 ^{a,b}	11279,9±1877,5 ^a	10177,1±1752,0 ^a
Jeicho	67,3±12,4 ^a	359,4±30,9 ^a	7,69±0,02 ^a	80±0 ^b	68,9±1,1 ^b	74,4±2,4 ^b	89,6±3,9 ^a	71,3±6,5 ^a	23501,8±4222,7 ^a	16213,9±2980,4 ^a	12353,3±2385,3 ^a
Mozo	20±0 ^a	283,5±87,5 ^a	-	85±5 ^{a,b}	75±5 ^{a,b}	88,5±1,5 ^a	-	79,5±13,5 ^a	5670±1750 ^b	4340±1596 ^a	3816,9±1347,4 ^a
Otsu	34,1±6,5 ^a	344,7±34,9 ^a	7,55±0,06 ^a	88,9±1,1 ^a	78,9±1,1 ^a	89,3±1,3 ^a	88,8±3,4 ^a	68±3,9 ^a	10099,9±1653,8 ^{a,b}	7970,7±1329,8 ^a	7231,1±1253,3 ^a
Pícaro	58,8±15,7 ^a	288,4±29,3 ^a	7,68±0,06 ^a	83,3±2,4 ^{a,b}	72,2±2,2 ^{a,b}	85,4±3,4 ^{a,b}	84,2±7 ^a	67,3±3,4 ^a	17277,2±5626,7 ^{a,b}	12558,3±3974,7 ^a	10927,4±3421,9 ^a
Puertollano	51,1±10,2 ^a	329,2±23,7 ^a	7,62±0,02 ^a	87,2±1,5 ^{a,b}	77,2±1,5 ^{a,b}	85,3±2,8 ^{a,b}	74,7±4,3 ^a	62,7±4,8 ^a	15464,6±2479,4 ^{a,b}	11786,9±1734,7 ^a	10122,8±1545,2 ^a

Media (Media ± error típico de la media)

Vo: volumen (fracción libre de gel); **Cc:** concentración; **PH:** pH; **MT:** motilidad total; **MP:** motilidad progresiva; **N:** espermatozoides morfológicamente normales; **A:** acrosomas normales; **HOS:** positivos al test hiposmótico; **NT:** número total de espermatozoides en el eyauclado; **NTMP:** número total de espermatozoides en el eyauclado con motilidad progresiva; **NTMPN:** número total de espermatozoides en el eyauclado con motilidad progresiva y morfológicamente normales.

A pesar de los amplios rangos no encontramos diferencias significativas entre individuos para la mayoría de los parámetros estudiados (Vo, Cc, pH, %A, %HOS, NTMP y NTMPN); uno de los animales Mozo produjo menos espermatozoides por eyaculado que los demás. En el caso de Jeicho la MT, MP y %N fueron significativamente inferiores al resto de la muestra.

Como hemos indicado las morfoanomalías fueron agrupadas según la clasificación de Jask y col. (1990^a) para caballos. Los resultados pueden observarse en la siguiente tabla.

Tabla 4.1-3: Morfoanomalías de los espermatozoides del burro de raza Zamorano-Leonesa.

MORFOLOGÍA	MEDIA	RANGO
N	86,61±1,27	64-99
Ca	0,63±0,17	0-4
Cs	1,32±0,3	0-6
Pi	3,82±0,74	0-23
CI	4,74±0,72	0-22
GP	2,89±0,45	0-13
GD	0,00±0,00	0-0
>	7,34±0,98	1-27
<	6,05±0,75	0-13

Media (Media ± error típico de la media)

Morfología espermática: (N) Normal (Cs) Cabezas sueltas (Ca) Cabezas anormales (Pi) Pieza intermedia anormal (CI) Cola anormal (GP) Gota citoplasmática proximal (GD) Gota citoplasmática distal (>) Morfoanomalías mayores (<) Morfoanomalías menores.

Mediante un análisis de la varianza univariante y la prueba post hoc (Student-Newman-Keuls), estudiamos las diferencias entre individuos de las distintas morfoanomalías (Sig. < 0,05). Los resultados se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 4.1-4: Valores promedio por individuo de las morfoanomalías espermáticas.

IND	N	Ca	Cs	Pi	CL	GP	GD	>	<
Gerinaldo	80,7±1,9 ^{a,b}	0,56±0,29 ^a	1,56±0,71 ^a	6,89±1,24 ^b	3,89±0,79 ^a	6,44±1,37 ^a	0	11,67±2,17 ^a	6,67±1,6 ^a
Igloo	90,3±3,0 ^a	1±0,47 ^a	0,56±0,29 ^a	1,67±0,60 ^c	2,56±1,39 ^a	3,89±2,79 ^a	0	3,83±1,01 ^b	3,5±2,11 ^a
Jeicho	74,4±2,4 ^b	1,89±0,82 ^a	1,56±0,69 ^a	11±1,91 ^a	6±1,52 ^a	5,11±1,36 ^a	0	16,5±2,35 ^a	6,67±0,67 ^a
Mozo	88,5±1,5 ^a	2,5±1,5 ^a	0±0 ^a	1,5±1,5 ^c	6±1 ^a	1,5±0,5 ^a	0	5,5±2,5 ^b	6±1 ^a
Otsu	89,3±1,3 ^a	1,33±0,60 ^a	2,22±0,79 ^a	2,67±0,73 ^{b,c}	2,33±0,44 ^a	2,11±0,45 ^a	0	3,33±0,76 ^b	5±0,89 ^a
Pícaro	85,4±3,4 ^{a,b}	1,44±0,82 ^a	0,11±0,11 ^a	2,89±0,75 ^{b,c}	4±1,75 ^a	6,11±1,84 ^a	0	6,5±1,36 ^b	3,67±1,6 ^a
Puertollano	85,3±2,8 ^{a,b}	0,56±0,38 ^a	1,33±0,87 ^a	0,56±0,34 ^c	9,56±2,49 ^a	2,67±0,75 ^a	0	2,83±1,31 ^b	10,83±2,82 ^a

Media (Media ± error típico de la media)

Morfología espermática (**N**) Normal (**Cs**) Cabezas sueltas (**Ca**) Cabezas anormales (**Pi**) Pieza intermedia anormal (**Cl**) Cola anormal (**GP**) Gota citoplasmática proximal (**GD**) Gota citoplasmática distal (>) Morfoanomalías mayores (<) Morfoanomalías menores.

Gerinaldo presenta un número de morfoanomalías de la pieza intermedia significativamente mayor que la mayoría de los individuos de la muestra, presentando por tanto un mayor porcentaje de morfoanomalías mayores.

En el caso de Jeicho el porcentaje de morfoanomalías es significativamente mayor que en el resto de los animales, como se observa en la tabla 4.1-4, esto es debido al porcentaje significativamente superior de espermatozoides con el tracto intermedio dañado, presentando por tanto un porcentaje de morfoanomalías mayores significativamente más alto.

4.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa.

En total se procesaron 38 eyaculados de los cuales 20 fueron recogidos con vagina cerrada y 18 con vagina abierta. Para el análisis de los resultados realizamos:

Evaluación del tiempo de conservación de la motilidad progresiva.

Para realizar este análisis fijamos como tiempo máximo (Tmax) aquel en el que observamos por última vez una motilidad progresiva mayor o igual al 30% y evaluamos mediante un análisis de la varianza univariante y test de Duncan qué variable influye más en este Tmax:

- a.- Existencia o no de plasma seminal mediante los métodos de recogida o centrifugación (recogido con vagina abierta "AA", recogido con vagina cerrada y centrifugado "CC", recogido con vagina cerrada y no centrifugado "CNC")
- b.- Diluyente (INRA 82 "I", Kenney "K", Leche "L" y Tris "T")
- c.- Temperatura de conservación (20°C "20", 15°C "15" y 4°C "4")
- d.- Interacción entre estas tres variables (36 tratamientos).

Evaluación de la calidad seminal en las primeras 48 horas de conservación.

Realizamos una selección previa de aquellos tratamientos que permiten conservar por más tiempo la motilidad progresiva por encima del 30% y evaluamos mediante un análisis de la varianza univariante y test de Ducan la motilidad total (MT), la motilidad progresiva (MP) y la integridad de la membrana plasmática (HOS) de los espermatozoides sometidos a estos tratamientos a las 12, 24, 36 y 48 horas de conservación.

4.2.1. Evaluación del tiempo de conservación de la motilidad progresiva.

a.- Efecto del método de recogida y la centrifugación.

El método de recogida y la centrifugación influyen significativamente ($<0,005$) sobre el tiempo de conservación de la motilidad progresiva como puede observarse en la gráfica 4.2-1 y tabla 4.2-1. Se obtiene un tiempo de conservación mayor cuando el semen se recoge con vagina artificial cerrada y se centrifuga (CC), mientras el menor tiempo de conservación de la MP lo obtenemos con el semen que conserva el plasma seminal (CNC).

Gráfica 4.2-1: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación.

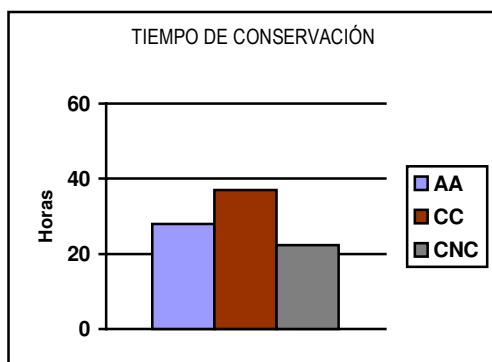


Tabla 4.2-1: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación.

MR/PS	Tiempo
AA	27,90±1,75 ^b
CC	37,05±2,26 ^a
CNC	22,30±1,10 ^c

*Tmax: horas
(media ± error estandar)*

Si evaluamos los datos en cada una de las temperaturas de conservación vemos que “CC” es siempre el método de recogida que mantiene más tiempo la motilidad progresiva, como puede observarse en la gráfica 4.2-2 y tabla 4.2-2.

Gráfica 4.2-2: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación.

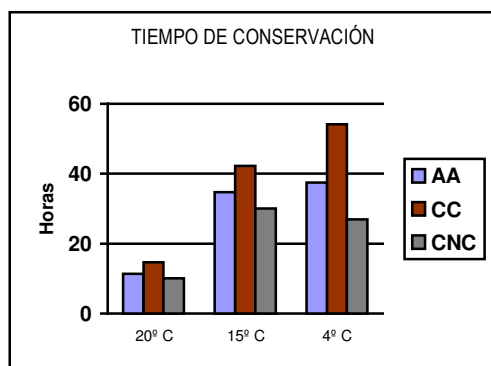


Tabla 4.2-2: Efecto del método de recogida y centrifugación en el tiempo de conservación según la temperatura.

MR/PS	20° C	15° C	4° C
AA	11,33±1,25 ^{ab}	34,83±3,10 ^{ab}	37,50±3,29 ^b
CC	14,70±1,58 ^a	42,30±3,45 ^a	54,15±4,64 ^a
CNC	10,05±1,05 ^b	30,00±2,82 ^b	26,85±2,87 ^c

Tmax: horas (media ± error estandar)

b. Efecto del diluyente

El diluyente influye significativamente ($<0,005$) sobre el tiempo de conservación como se observa en la gráfica 4.2-3 y en la tabla 4.2-3. Se obtiene un tiempo de conservación mayor cuando se utiliza diluyente INRA 82 (I).

Gráfica 4.2-3: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.

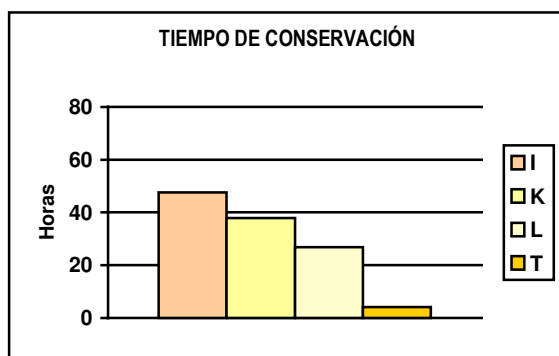


Tabla 4.2-3: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.

D	GENERAL
I	47,45±2,43 ^a
K	37,76±2,06 ^b
L	26,84±1,76 ^c
T	4,26±0,59 ^d

Tmax: horas (media ± error estandar)

Si evaluamos los datos en cada una de las temperaturas de conservación vemos que "I" es siempre el método de recogida que mantiene más tiempo la motilidad progresiva, como puede observarse en la gráfica 4.2-4 y tabla 4.2-4, seguido de Kenney (K), Leche (L) y finalmente el diluyente Tris (T) es siempre el que menos tiempo mantuvo la MP.

Gráfica 4.2-4: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación.

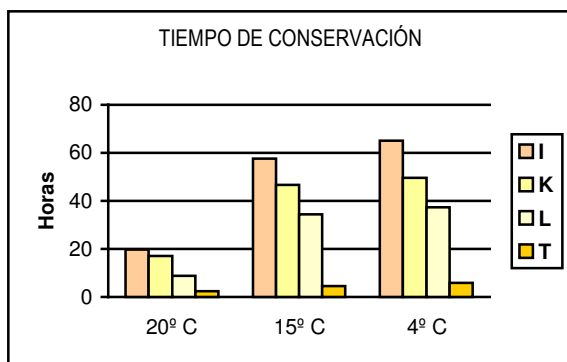


Tabla 4.2-4: Efecto del diluyente en el tiempo de conservación según la temperatura.

D	20° C	15° C	4° C
I	19,84±1,43 ^a	57,47±3,10 ^d	65,04±4,64 ^a
K	17,11±1,70 ^a	46,60±3,07 ^b	49,58±3,90 ^b
L	8,87±1,96 ^b	34,27±2,66 ^c	37,40±3,38 ^c
T	2,29±0,62 ^c	4,51±1,06 ^d	5,98±1,23 ^d

Tmax: horas (media ± error estandar)

c. Temperatura de conservación

La temperatura influye significativamente ($<0,005$) sobre el tiempo de conservación, como puede observarse en la gráfica 4.2-5 y en la tabla 4.2-5.

Gráfica 4.2-5: Efecto de la temperatura en el tiempo de conservación.

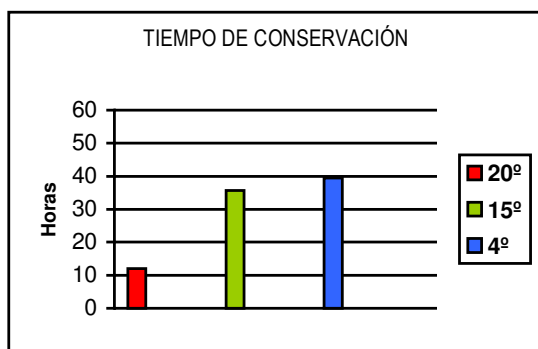


Tabla 4.2-5: Efecto de la temperatura en el tiempo de conservación.

T	HORAS
20	12,03±2,26 ^b
15	35,71±1,83 ^a
4	39,50±0,77 ^a

*Tiempo máximo de conservación en horas
(media ± error estandar)*

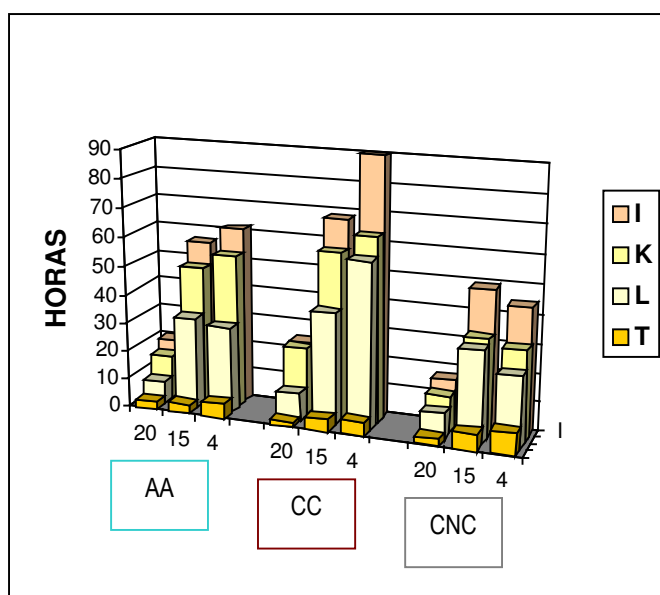
Con estos resultados observamos que la temperatura ambiente o control 20°C (20) conserva el semen durante menos tiempo que las temperaturas de refrigeración 4°C y 15°C (4 y 15).

d.- Interacción método de recogida, diluyente y temperatura

Las diferencias entre los diferentes tratamientos ($p < 0,05$) se pueden observar en la gráfica 4.2-6 y en la tabla 4.2-6.

Tabla 4.2-6: Tiempo de conservación del semen.

Gráfica 4.2-6: Tiempo de conservación del semen.



Según estos resultados el sistema que permite mantener la MP por encima del 30% durante más tiempo consiste en recogida del semen con vagina artificial cerrada, centrifugación (400g x 7 min), dilución en INRA 82, refrigeración y conservación a 4°C (CC x I x 4).

TRATAMIENTOS			T máx	
AA	I	20	19,33±2,19	klm
AA	I	15	56±5,82	bcdef
AA	I	4	61,33±5,30	bcd
AA	K	20	15,33±2,53	lmnn
AA	K	15	48±3,62	efg
AA	K	4	53,33±4,36	cdef
AA	L	20	8±1,94	mnn
AA	L	15	32±3,88	hijk
AA	L	4	30±3,91	ijk
AA	T	20	2,66±1,21	nn
AA	T	15	3,33±1,62	nñ
AA	T	4	5,33±2,42	nñ
CC	I	20	24±2,61	jkl
CC	I	15	67,8±4,63	b
CC	I	4	90±8,05	a
CC	K	20	23,4±3,42	jkl
CC	K	15	58,2±4,11	bcde
CC	K	4	64,2±6,76	bc
CC	L	20	9,6±1,86	mnn
CC	L	15	39±5,7	ghi
CC	L	4	57,6±6,49	bcde
CC	T	20	1,8±0,98	n
CC	T	15	4,2±1,8	nñ
CC	T	4	4,8±1,82	nñ
CNC	I	20	16,2±2,34	lmn
CNC	I	15	48,6±5,03	defg
CNC	I	4	43,8±6,53	fgh
CNC	K	20	12,6±2,21	lmnn
CNC	K	15	33,6±6,19	hij
CNC	K	4	31,2±6,47	hijk
CNC	L	20	9±1,19	mnn
CNC	L	15	31,8±3,91	hijk
CNC	L	4	24,6±3,53	jkl
CNC	T	20	2,4±1,10	nñ
CNC	T	15	6±2,04	mññ
CNC	T	4	7,8±2,18	mññ

T máx: horas (media ± error típico)

4.2.2. Evaluación de la calidad seminal en las primeras 48 horas de conservación.

Con el fin de continuar el estudio estadístico seleccionamos los siete tratamientos que permiten mantener más tiempo la motilidad progresiva y que se encuentran resumidos en la tabla 4.2-7

Tabla 4.2-7: Siete mejores tratamientos.

TRATAMIENTOS			Tmax
CC	I	4	90±8,05 ^a
CC	I	15	67,8±4,63 ^b
CC	K	4	64,2±6,76 ^b
AA	I	4	61,33±5,30 ^b
CC	K	15	58,2±4,11 ^b
CC	L	4	57,6±6,49 ^b
AA	I	15	56±5,82 ^b

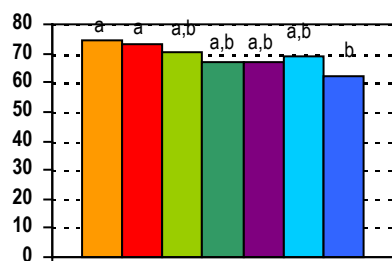
T max: horas (media ± error típico)

Para la evaluación de la calidad seminal analizamos la motilidad total (MT), la motilidad progresiva (MP) y la integridad de la membrana plasmática (HOS) y consideramos diferencias estadísticas $p > 0,05$. Los resultados se pueden observar en las siguientes gráficas y tablas para cada uno de los tiempos 12, 24, 36 y 48 horas.

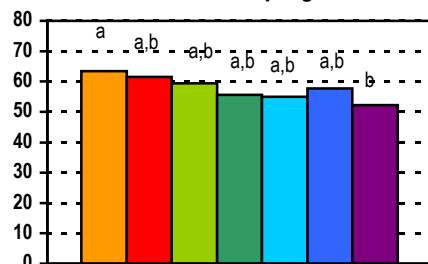
a.- A las 12 horas

Los datos de MT, MP y HOS a las 12 horas se pueden observar en las gráficas 4.2-7, 4.2-8 y 4.2-9 y en la tabla 4.2-8. El tratamiento CC I 15 fue el que mejor mantuvo la MT y la MP a las 12h de conservación, seguido de CC I 4, mientras que los peores resultados dentro de este grupo los obtuvimos en AA I 4. El tratamiento CC I 15 también fue el que mejor mantuvo la integridad de la membrana plasmática junto con el tratamiento AA I 15.

Gráfica 4.2-7: Motilidad total a 12 h.



Gráfica 4.2-8: Motilidad progresiva a 12 h.



Gráfica 4.2-9: Test hiposmótico a 12 h.

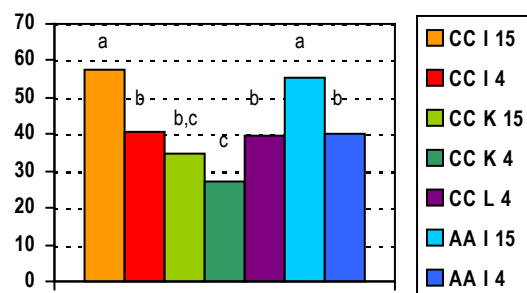


Tabla 4.2-8 Calidad del semen a las 12 horas.

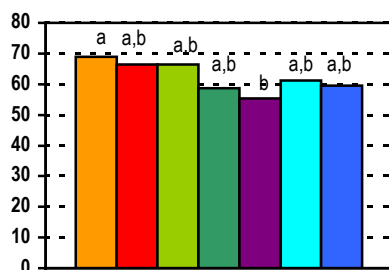
TRAT	MT	MP	HOS
CC I 15	74,5±2,85 ^a	63,5±2,93 ^a	57,35±2,3 ^a
CC I 4	73±3,17 ^a	61,5±3,18 ^{a, b}	40,85±2,5 ^b
CC K 15	70,5±3,03 ^{a, b}	59,5±3,03 ^{a, b}	34,75±2,80 ^{b, c}
CC K 4	66,75±3,77 ^{a, b}	55,5±4,32 ^{a, b}	27,35±3,81 ^c
CC L 4	66±3,19 ^{a, b}	55±3,44 ^{a, b}	39,45±3,03 ^b
AA I 15	69,17±2,43 ^{a, b}	57,78±2,75 ^{a, b}	55,11±3,76 ^a
AA I 4	62,22±2,07 ^b	52,22±2,07 ^b	40,39±3,52 ^b

Datos expresados en porcentaje (media ± error típico de la media)

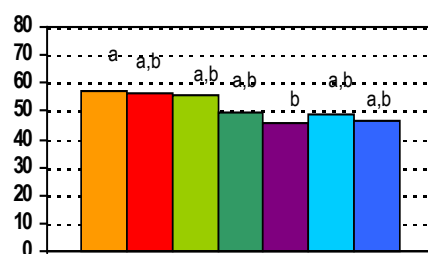
b. A las 24 horas

Los datos de MT, MP y HOS a las 24 horas se pueden observar en las gráficas 4.2-10, 4.2-11 y 4.2-12 y en la tabla 4.2-9. El tratamiento CC I 15 sigue siendo el que mejor permite mantener la MT y la MP, mientras que la MT y MP son significativamente inferiores en el diluyente de leche (CC L 4). La integridad de la membrana plasmática se mantuvo mejor en los tratamientos CC I 15 y AA I 15.

Gráfica 4.2-10: Motilidad total a 24 h.



Gráfica 4.2-11: Motilidad progresiva a 24 h.



Gráfica 4.2-12: Test hiposmótico a 24 h.

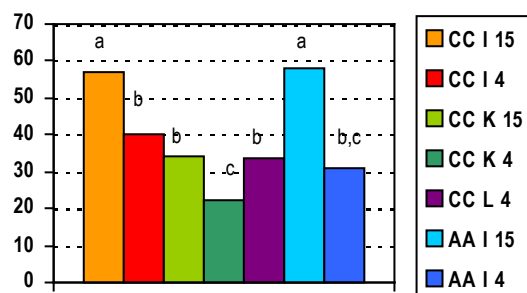


Tabla 4.2-9: Calidad del semen a las 24 horas.

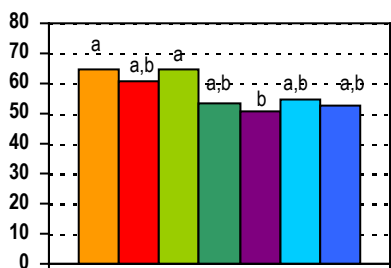
TRAT	MT	MP	HOS
CC I 15	69±3,47 a	57,5±3,76 a	56,95±4,11 a
CC I 4	66,5±3,57 a,b	56,25±3,46 a,b	40,25±3,51 b
CC K 15	66,5±3,01 a,b	55,5±3,20 a,b	34,25±3,65 b
CC K 4	58,75±4,5 a,b	49,75±4,24 a,b	22,15±2,45 c
CC L 4	55,25±4,43 b	46±4,06 b	33,4±3,28 b
AA I 15	61,11±3,01 a,b	48,89±3,22 a,b	58,05±5,04 a
AA I 4	59,44±1,89 a,b	46,67±2,29 a,b	30,67±2,92 b,c

Datos expresados en porcentaje
(media ± error típico)

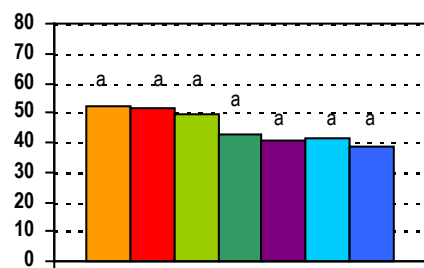
c. A las 36 horas

Los datos de MT, MP y HOS a las 36 horas se pueden observar en las gráficas 4.2-13, 4.2-14 y 4.2-15 y en la tabla 4.2-10. El tratamiento CC I 15 sigue siendo el que permite mantener la mejor MT a las 36 horas, mientras el diluyente de leche proporciona los peores resultados, por el contrario ya no se observan diferencias significativas en la MP obtenida en los diferentes tratamientos. Los tratamientos que mejor mantienen la integridad de la membrana plasmática son CC I 15 y AA I 15, mientras el peor resultado se obtiene con el semen centrifugado y mantenido en Kenney a 4°C (CC K 4).

Gráfica 4.2-13: Motilidad total a 36 h.



Gráfica 4.2-14: Motilidad progresiva a 36 h.



Gráfica 4.2-15: Test hiposmótico a 36 h.

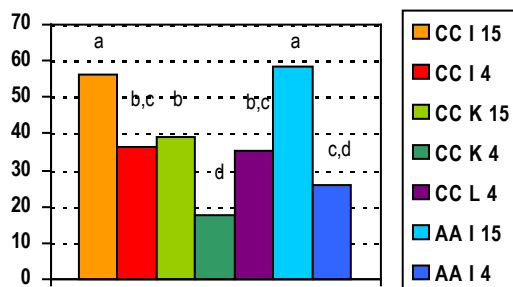


Tabla 4.2-10: Calidad del semen a las 36 horas.

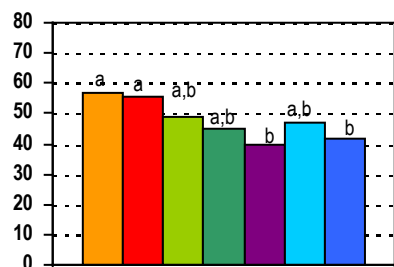
TRAT	MT	MP	HOS
CC I 15	65±3,44 a	52±3,81 a	56,3±4,59 a
CC I 4	61±3,55 a,b	51,5±3,35 a	36,35±3,18 b,c
CC K 15	64,5±3,03 a	49,5±4,26 a	39±4,25 b
CC K 4	53,5±5,04 a,b	42,75±4,97 a	17,55±2,29 d
CC L 4	51±5,02 b	41±4,75 a	35,25±3,51 b,c
AA I 15	54,44±4,52 a,b	41,67±4,14 a	58,22±4,31 a
AA I 4	52,78±2,89 a,b	38,89±3,32 a	25,67±3,66 c,d

Datos expresados en porcentaje
(media ± error típico)

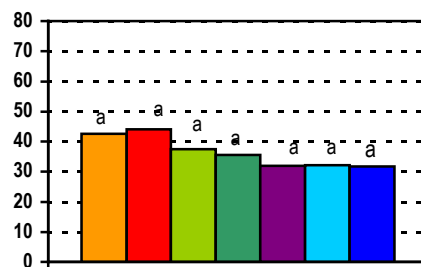
c. A las 48 horas

Los datos de MT, MP y HOS a las 36 horas se pueden observar en las gráficas 4.2-16, 4.2-17 y 4.2-18 y en la tabla 4.2-11. Los tratamientos en los que el semen se centrifuga y diluye en medio INRA (CC I 15 y CC I 4) siguen siendo los que mejor mantienen la MT, mientras que no se observan diferencias significativas en la MP. EL test HOS fue superior en los tratamientos CC I 15 y AA I 15.

Gráfica 4.2-16: Motilidad total a 48 h.



Gráfica 4.2-17: Motilidad progresiva a 48 h.



Gráfica 4.2-18: Test hiposmótico a 48 h.

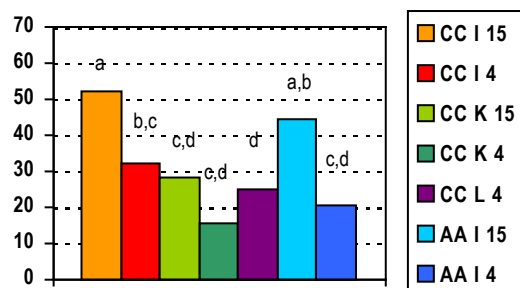


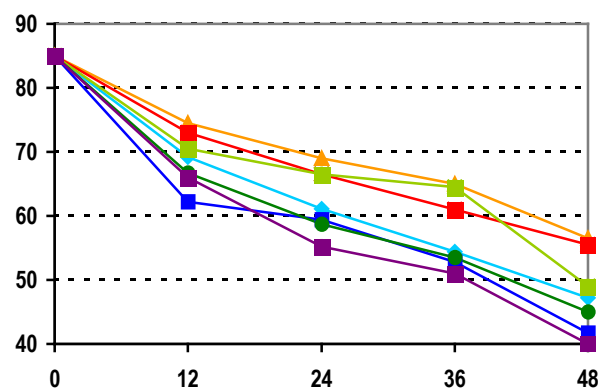
Tabla 4.2-11: Calidad del semen a las 48 horas.

TRAT	MT	MP	HOS
CC I 15	56,5±3,01 ^a	42,5±3,15 ^a	52,15±5,79 ^a
CC I 4	55,5±3,12 ^a	44±3,51 ^a	32,3±3,48 ^{b,c}
CC K 15	49±3,90 ^{a,b}	37,5±3,76 ^a	28,1±3,89 ^{c,d}
CC K 4	45±5,31 ^{a,b}	35,5±4,67 ^a	15,8±2,42 ^d
CC L 4	40±5,33 ^b	32±4,56 ^a	25,25±4,86 ^{c,d}
AA I 15	47,22±4,41 ^{a,b}	32,2±4,24 ^a	44,39±8,31 ^{a,b}
AA I 4	41,67±5,06 ^b	31,67±4,14 ^a	20,56±3,11 ^{c,d}

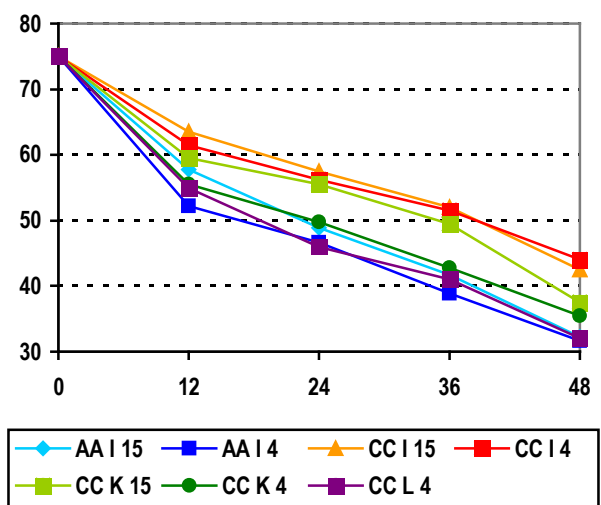
Datos expresados en porcentaje
(media ± error típico)

En las siguientes gráficas podemos observar la motilidad total, la motilidad progresiva y el test hiposmótico de estos siete tratamientos a lo largo del tiempo.

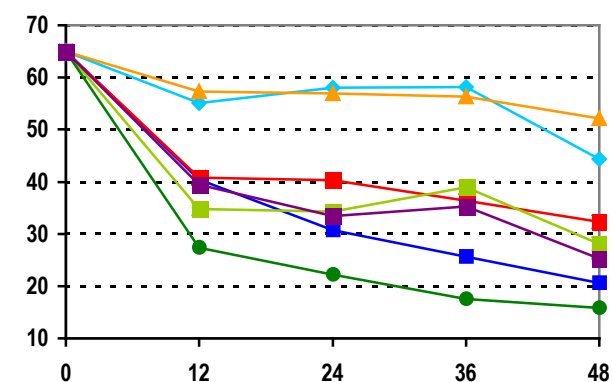
Gráfica 4.2-19: Porcentaje de MT a lo largo del tiempo.



Gráfica 4.2-20: Porcentaje de MP a lo largo del tiempo.

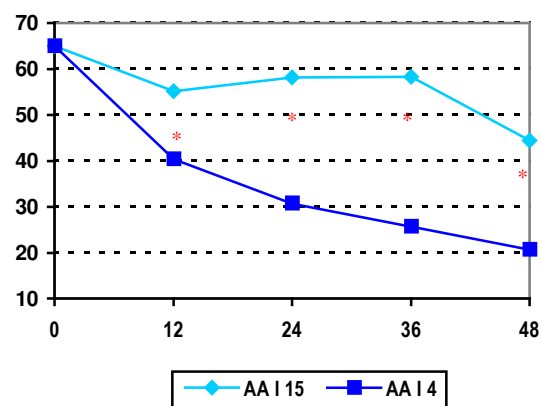


Gráfica 4.2-21: Porcentaje de HOS a lo largo del tiempo.

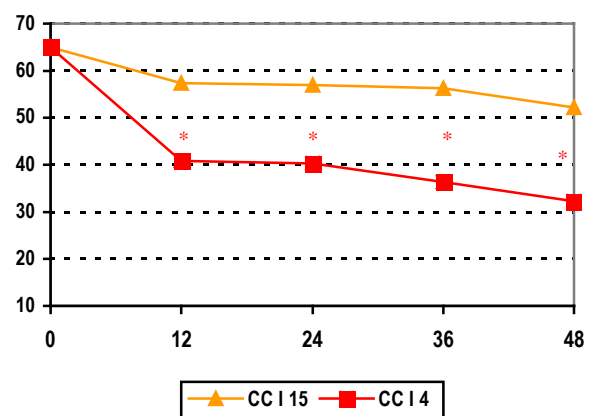


En las gráficas siguientes podemos observar la integridad de la membrana plasmática según la temperatura para el mismo método de recogida y diluyente.

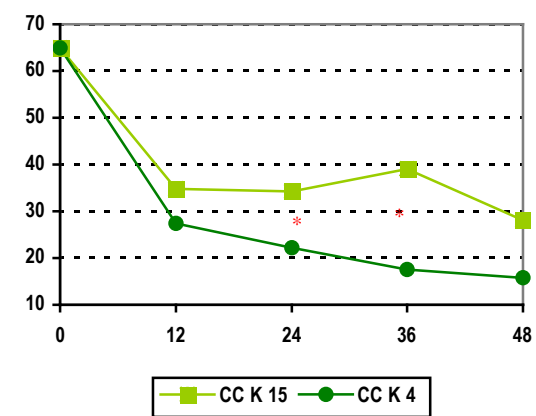
Gráfica 4.2-22: % HOS a lo largo del tiempo (AA x I).



Gráfica 4.2-23: % HOS a lo largo del tiempo (CC x I).



Gráfica 4.2-24: % HOS a lo largo del tiempo (CC x K).



4.3 Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa.

4.3.1. Evaluación de las muestras tras la descongelación.

En este estudio hemos evaluado las muestras inmediatamente después de la descongelación (tiempo 0h). Para el estudio estadístico de los datos obtenidos se ha utilizado el Test de Duncan (Sig<0,05). Los resultados se pueden observar en las gráficas y tabla siguientes:

Gráfica 4.3-1: % de motilidad total (MT) y progresiva (MP) del semen descongelado

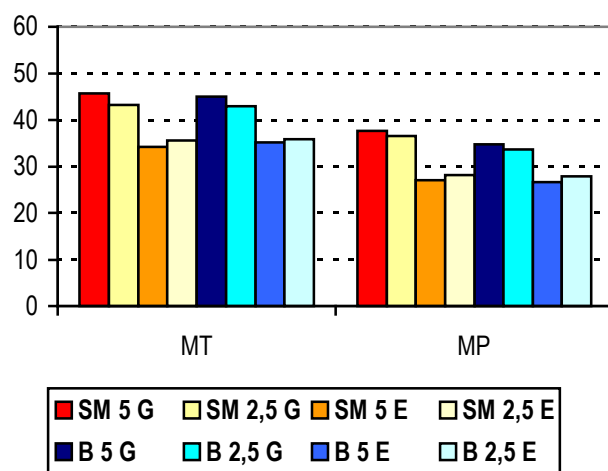


Tabla 4.3-1: % de motilidad total (MT) y progresiva (MP) del semen descongelado

D	C	Cc	MT	MP
SM	G	5	45,7±1,8 ^a	37,6±4,5 ^a
SM	G	2,5	43,2±3,4 ^{a,b}	36,5±3,3 ^{a,b}
SM	E	5	34,2±3,2 ^b	27,1±2,8 ^{b,c}
SM	E	2,5	35,6±3,4 ^{a,b}	28,1±3,2 ^{a,b,c}
B	G	5	45,0±2,5 ^{a,b}	34,8±2,5 ^{a,b,c}
B	G	2,5	42,9±3,1 ^{a,b}	33,7±2,9 ^{a,b,c}
B	E	5	35,2±2,8 ^{a,b}	26,6±2,2 ^c
B	E	2,5	35,9±2,9 ^{a,b}	27,8±2,6 ^{b,c}

Media ± error típico de la media

D: diluyente; SM: SMEY; B: BURNS; C: crioprotector; G: glicerol; E: etilenglicol; Cc: concentración de crioprotector (%); MT: motilidad total (%); MP: motilidad progresiva (%).

Los tratamientos en que usamos el etilenglicol como crioprotector presentan menor porcentaje de motilidad total y progresiva que los tratamientos con glicerol. No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la motilidad total y progresiva entre diluyentes ni entre concentraciones de crioprotector.

Gráfica 4.3-2: Características de la motilidad del semen descongelado: VCL, VSL, VAP

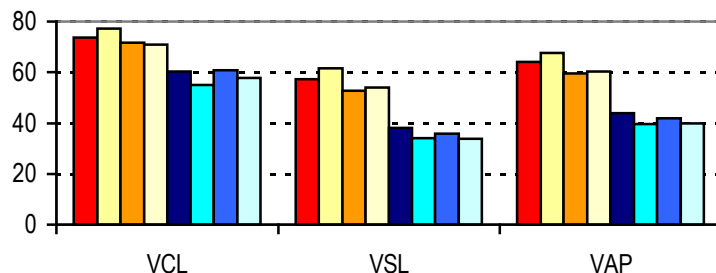


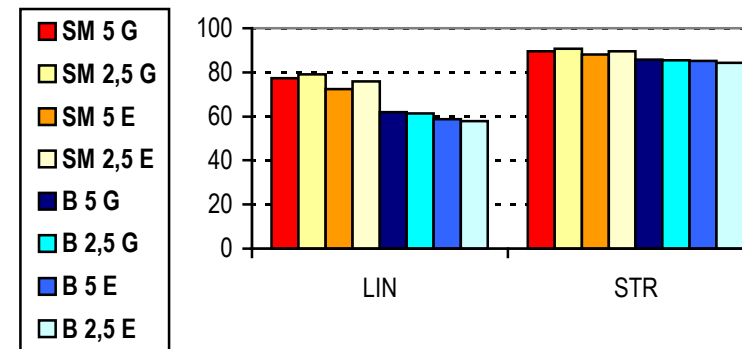
Tabla 4.3-2: Características de la motilidad del semen descongelado: VCL, VSL, VAP, LIN, STR

D	C	Cc	VCL	VSL	VAP	LIN	STR
SM	G	5	73,8±3,7 ^a	57,3±3,2 ^a	64,1±3,5 ^a	77,4±1,6 ^{a, b}	89,4±0,9 ^a
SM	G	2,5	77,1±4,2 ^a	61,6±4 ^a	67,7±4,2 ^a	79,0±1,6 ^a	90,7±0,6 ^a
SM	E	5	71,7±4,5 ^a	52,8±4,3 ^a	59,5±4,5 ^a	72,3±2,1 ^b	88,1±1,0 ^{a, b}
SM	E	2,5	70,8±4,1 ^a	54,1±3,5 ^a	60,3±3,8 ^a	76,0±1,2 ^{a, b}	89,6±0,7 ^a
B	G	5	60,3±2,5 ^b	38,1±2,5 ^b	43,9±2,5 ^b	62±2,1 ^c	85,8±1,1 ^{b, c}
B	G	2,5	54,9±2,9 ^b	34,1±2,5 ^b	39,5±2,6 ^b	61,2±1,9 ^c	85,5±0,9 ^{b, c}
B	E	5	60,7±2,5 ^b	35,8±1,8 ^b	41,9±1,8 ^b	58,8±1,4 ^c	85,1±0,9 ^c
B	E	2,5	57,9±2,9 ^b	33,9±2,4 ^b	39,9±2,4 ^b	57,8±1,9 ^c	84,2±1,3 ^c

Media ± error típico de la media

D: diluyente; SM: SMEY; B: BURNS; C: crioprotector; G: glicerol; E: etilenglicol; Cc: concentración de crioprotector (%); VCL: velocidad curvilínea (µm/s); VSL: velocidad rectilínea (µm/s); VAP: velocidad promedio (µm/s); LIN: índice de linealidad (%); STR: índice de rectitud (%).

Gráfica 4.3-3: Características de la motilidad del semen descongelado: LIN, STR



Con el diluyente SMEY obtuvimos mejores características de la motilidad en la descongelación; no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a las características de la motilidad ni entre crioprotectores ni entre las distintas concentración de cada crioprotector.

Gráfica 4.3-4: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado

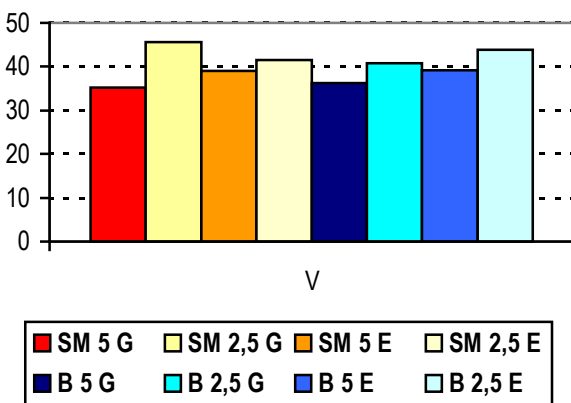


Tabla 4.3-3: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado

D	C	Cc	V
SM	G	5	35,24±3,02 ^b
SM	G	2,5	45,55±3,23 ^a
SM	E	5	39,10±2,74 ^{ab}
SM	E	2,5	41,51±2,79 ^{ab}
B	G	5	36,21±2,63 ^b
B	G	2,5	40,83±3,26 ^{ab}
B	E	5	39,18±2,34 ^{ab}
B	E	2,5	43,85±2,83 ^{ab}

Media ± error típico de la media

D: diluyente; **SM:** SMEY; **B:** BURNS; **C:** crioprotector; **G:** glicerol; **E:** etilenglicol; **Cc:** concentración de crioprotector (%); **V:** espermatozoides vivos con acrosoma intacto (%).

Los tratamientos con un 5% de crioprotector tienden a presentar menor porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto que los que llevan un 2.5%. No hemos encontrado diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en cuanto al diluyente o tipo de crioprotector.

Gráfica 4.3-5: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado

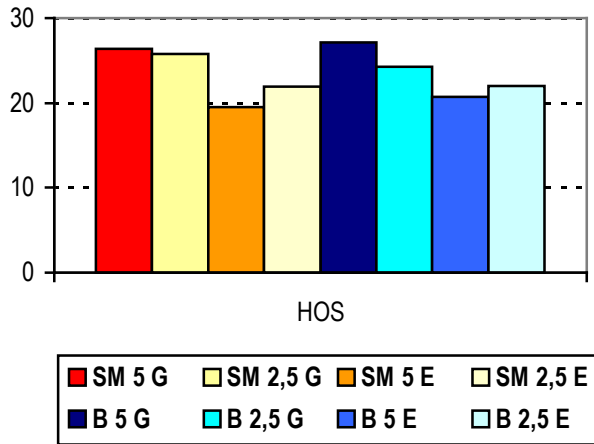


Tabla 4.3-4: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado

D	C	Cc	HOS
SM	G	5	26,4±1,6 ^a
SM	G	2,5	25,8±1,6 ^{a, b}
SM	E	5	19,5±1,8 ^c
SM	E	2,5	21,9±1,9 ^{a, b, c}
B	G	5	27,1±1,8 ^a
B	G	2,5	24,3±1,8 ^{a, b, c}
B	E	5	20,7±1,5 ^{b, c}
B	E	2,5	22±1,6 ^{a, b, c}

Media ± error típico de la media

D: diluyente; **SM:** SMEY; **B:** BURNS; **C:** crioprotector; **G:** glicerol; **E:** etilenglicol; **Cc:** concentración de crioprotector (%); **HOS:** espermatozoides con integridad de la membrana plasmática(%).

Los tratamientos con glicerol tienden a preservar mejor la integridad de la membrana plasmática en la descongelación. No hemos encontrado diferencias significativas en el test hiposmótico en cuanto al diluyente ni en cuanto a la concentración de crioprotector.

4.3.2. Evaluación de las muestras después de una hora de incubación a 37°C.

Para este estudio hemos evaluado las muestras una hora después de la descongelación (tiempo 1h) mantenidas en el baño maría a 37°C. Para el estudio estadístico de los datos obtenidos se ha utilizado el Test de Duncan (Sig<0,05). Los resultados se pueden observar en las gráficas y tabla siguientes:

Gráfica 4.3-6: % de motilidad total (MT 1h) y progresiva (MP 1h) del semen descongelado incubado 1 hora

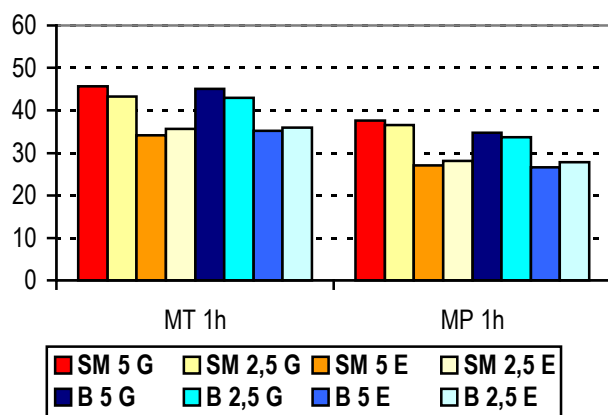


Tabla 4.3-5: % de motilidad total (MT 1h) y progresiva (MP 1h) del semen descongelado incubado 1 hora

D	C	Cc	MT 1 h	MP 1 h
SM	G	5	27,2±3,8 ^{a, b, c}	21,6±3,4 ^{a, b, c}
SM	G	2,5	31,6±3,0 ^{a, b}	25,3±2,7 ^{a, b}
SM	E	5	20,4±2,5 ^c	15,1±2,1 ^c
SM	E	2,5	24,7±3,6 ^{b, c}	19,65±3,4 ^{a, b, c}
B	G	5	29,8±2,6 ^{a, b, c}	19,1±2,1 ^{a, b, c}
B	G	2,5	35,1±3,4 ^a	26,9±3,2 ^a
B	E	5	23,8±2,2 ^{b, c}	16,8±2,0 ^{b, c}
B	E	2,5	26,9±2,9 ^{a, b, c}	19,5±2,6 ^{a, b, c}

Media ± error típico de la media

D: diluyente; SM: SMEY; B: BURNS; C: crioprotector; G: glicerol; E: etilenglicol; Cc: concentración de crioprotector (%); MT 1h: motilidad total después de 1 hora de incubación (%); MP 1h: motilidad progresiva después de 1 hora de incubación (%).

Los tratamientos que usan el etilenglicol como crioprotector presentan menor porcentaje de MT y MP que los tratamientos que usan glicerol después de una hora de incubación. Los tratamientos con 2.5% de crioprotector tienden a presentar mayor MT y MP una hora después de la incubación. Los tratamientos con diluyente Burns tienden a presentar mejores porcentajes de "MT 1h" pero no hemos encontrado diferencias significativas ni en la "MT 1h" ni en la "MP 1h" entre los dos diluyentes.

Gráfica 4.3-7: Características de la motilidad del semen descongelado después de 1 hora de incubación: VCL 1 h, VSL 1h, VAP 1h

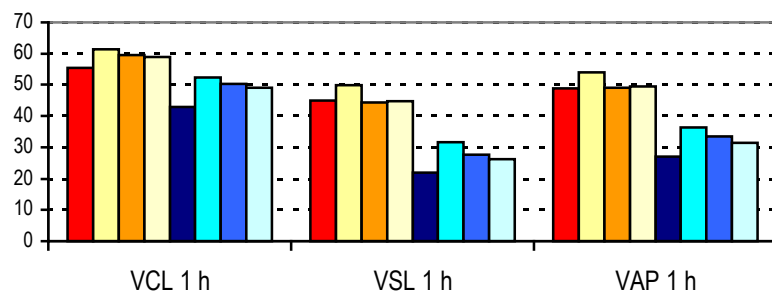


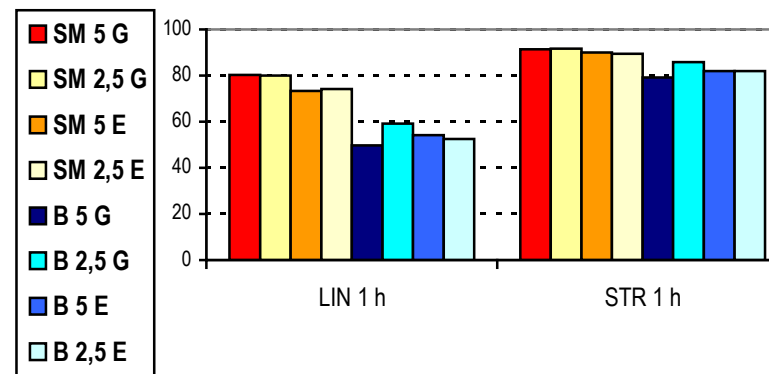
Tabla 4.3-6: Características de la motilidad del semen descongelado después de 1 hora de incubación: VCL 1h, VSL 1h, VAP 1h, LIN 1h, STR 1h

D	C	Cc	VCL 1 h	VSL 1 h	VAP 1 h	LIN 1 h	STR 1 h
SM	G	5	55,5±3,5 ^{a, b, c}	45,0±3,2 ^a	48,9±3,3 ^a	80,4±1,3 ^a	91,5±0,6 ^a
SM	G	2,5	61,4±3,6 ^a	49,9±3,7 ^a	53,9±3,6 ^a	79,9±1,8 ^a	91,7±1,0 ^a
SM	E	5	59,6±3,5 ^{a, b}	44,4±3,4 ^a	49,1±3,6 ^a	73,2±1,8 ^b	89,9±0,8 ^a
SM	E	2,5	58,9±3,9 ^{a, b, c}	44,7±3,8 ^a	49,5±3,9 ^a	74,3±2,0 ^b	89,5±1,1 ^a
B	G	5	43,0±2,4 ^d	21,9±2,1 ^c	27,1±1,9 ^c	49,7±2,2 ^d	79,2±1,7 ^c
B	G	2,5	52,4±3,2 ^{a, b, c, d}	31,6±2,6 ^b	36,4±2,6 ^b	59,2±1,6 ^c	85,9±0,9 ^b
B	E	5	50,2±2,7 ^{b, c, d}	27,8±2,1 ^{b, c}	33,5±2,3 ^{b, c}	54,1±1,8 ^d	82,0±1,5 ^c
B	E	2,5	49±2,5 ^{c, d}	26,2±2,0 ^{b, c}	31,5±1,9 ^{b, c}	52,6±1,8 ^d	81,9±1,3 ^c

Media ± error típico de la media

D: diluyente; SM: SMEY; B: BURNS; C: crioprotector; G: glicerol; E: etilenglicol; Cc: concentración de crioprotector (%); VCL 1h: velocidad curvilínea (µm/s); VSL 1h: velocidad rectilínea (µm/s); VAP 1h: velocidad promedio (µm/s); LIN 1 h: índice de linealidad (%); STR 1h: índice de rectitud (%).

Gráfica 4.3-8: Características de la motilidad del semen descongelado después de 1 hora de incubación: LIN 1h, STR 1h



El diluyente SMEY presentó siempre mejores características de la motilidad después de una hora de incubación, los tratamientos en los que se empleó medio SMEY con glicerol presentaron mejores índices de linealidad (LIN) que los tratamientos de SMEY con etilenglicol o medio BURNS independientemente del crioprotector.

Gráfica 4.3-9: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado después de 1 hora de incubación

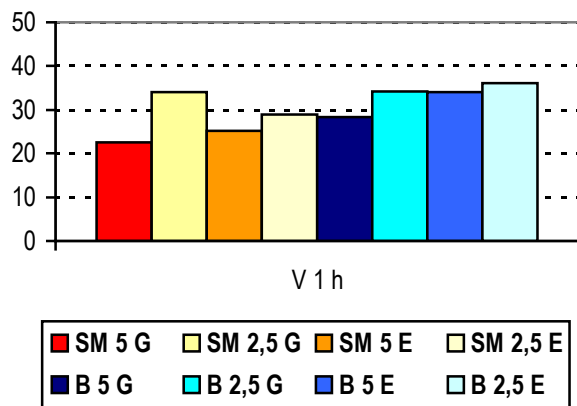


Tabla 4.3-7: % de espermatozoides vivos con acrosoma intacto del semen descongelado después de 1 hora de incubación

D	C	Cc	V 1 h
SM	G	5	22,48±2,38 ^b
SM	G	2,5	34,09±2,59 ^a
SM	E	5	25,19±2,56 ^b
SM	E	2,5	29,09±2,18 ^{ab}
B	G	5	28,39±2,32 ^{ab}
B	G	2,5	34,28±2,95 ^a
B	E	5	34,02±2,54 ^a
B	E	2,5	36,15±2,54 ^a

Media ± error típico de la media

D: diluyente; **SM:** SMEY; **B:** BURNS; **C:** crioprotector; **G:** glicerol; **E:** etilenglicol; **Cc:** concentración de crioprotector (%); **V 1h:** espermatozoides vivos con acrosoma intacto después de una hora de incubación (%).

Los tratamientos SMEY con un 5% de crioprotector tienden a presentar menor porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto que los que llevan un 2.5% y que los diluyentes BURNS después de una hora de incubación.

Gráfica 4.3-10: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado incubado 1 hora

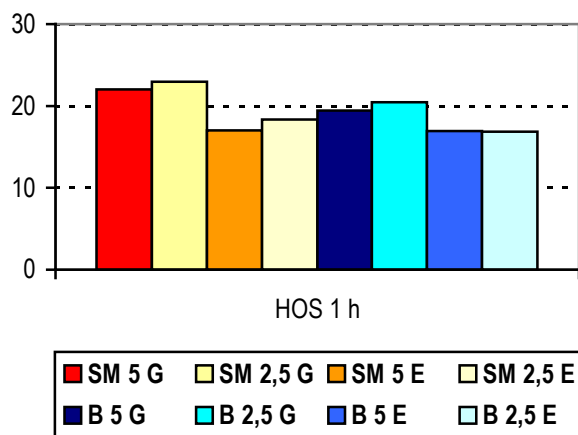


Tabla 4.3-8: % de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra del semen descongelado incubado 1 hora

D	C	Cc	HOS 1 h
SM	G	5	22±1,8 ^{a, b}
SM	G	2,5	23±1,5 ^a
SM	E	5	17,0±1,2 ^c
SM	E	2,5	18,33±1,6 ^{b, c}
B	G	5	19,44±1,3 ^{a, b, c}
B	G	2,5	20,5±1,3 ^{a, b, c}
B	E	5	16,94±1,4 ^c
B	E	2,5	16,9±1,3 ^c

Media ± error típico de la media

D: diluyente; **SM:** SMEY; **B:** BURNS; **C:** crioprotector; **G:** glicerol; **E:** etilenglicol; **Cc:** concentración de crioprotector (%); **HOS 1 h:** espermatozoides la membrana plasmática íntegra después de una hora de incubación (%).

Los tratamientos con glicerol tienden a presentar mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra después de 1 hora de incubación. No hemos encontrado diferencias significativas en el test hiposmótico una hora después de la incubación en cuanto al diluyente ni en cuanto a la concentración de crioprotector.



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Experiencia 1. Estudio de las características seminales del burro de raza Zamorano-Leonesa.

Al igual que otros autores (Kreuchauf, 1983, Henry y col. 1987^b, 1991, 1998, 2001; Lodi y col., 1995; Gastal y col., 1996, 1997; Taylor y col., 2002) observamos que el tiempo de reacción en los burros es mayor que en los caballos y en ocasiones es difícil o incluso imposible obtener semen dentro del tiempo máximo de espera que nos marcamos, 1 hora. Ninguno de los animales utilizados para este estudio rechazó la recogida del semen con vagina artificial; la facilidad del entrenamiento de los animales a la recogida con vagina artificial ha sido destacada por otros autores (Henry y col., 1987^c, 1998; Gastal y col., 1996, Kreuchauf, 1983, Taylor y col., 2002; Trimeche, 1996^a).

Algunos autores han descrito que la presencia de gel en los eyaculados de burro es menos frecuente que en los eyaculados de caballo y que cuando existe es en menor cantidad (Nishikawa, 1951-citado por Thompson y Evans, 1992; Gastal y col., 1997; Kreuchauf, 1983; Mello y col., 2000; Batista, 2003), en nuestro estudio no hemos encontrado gel en ninguno de los eyaculados.

El volumen del eyaculado en los garañones utilizados ha oscilado entre 20 y 140 ml, los datos publicados sobre el volumen del semen de garañón son muy variables; así algunos autores describen para los asnos un volumen de eyaculado bajo: 39.9 ml (Costa y col., 1991^a), 29.2-31.7 ml (Gastal y col., 1997), 25-45 ml (Mello y col., 2000); y otros aportan datos de volumen mayores: 71.6 ml (Gokcen y col., 1993), 59.44 ml (Morais y col., 1994^b), 26-70 ml (Henry y col., 1999), 70 ml (Boeta y Zarco-Quintero, 2000); 37-103 ml (Miró y col., 2003^b); 56 ml (Batista, 2003) estas diferencias podrían ser debidas a la edad, la raza o el grado de excitación. Esta variabilidad en el volumen del eyaculado también está descrita en el caballo (Pattie y Dowsett, 1982), y el rango aportado en la bibliografía (40-150 ml) (Pickett y col., 1976) es similar al encontrado en nuestro estudio para el burro Zamorano-Leones.

Al igual que describen la mayoría de los autores, en nuestro estudio la concentración de espermatozoides en el eyaculado de burro ($140\text{-}547 \times 10^6$ esp/ml) es muy variable, Costa y col. en dos estudios del mismo año obtienen una media de $342,6 \pm 195,8 \times 10^6$ esp/ml (Costa y col. 1991^a) y un rango de $188,3$ a $289,7 \times 10^6$ esp/ml (Costa y col., 1991^b), Gokcen y col. (1993) aportan datos de concentración de 406×10^6 esp/ml, Morais y col. (1994^b) una media de $444,11 \pm 182,72 \times 10^6$ esp/ml, Santos y col. (1995) entre 252 y 610×10^6 esp/ml, Henry y col. (1999) entre $34,5$ a $101,9 \times 10^6$ esp/ml y la concentración de espermatozoides del semen de garañón de raza Catalana presenta en un estudio un rango desde $209\text{-}230 \times 10^6$ esp/ml (Miró y col., 2003^b) y en otro una media de $280,88 \times 10^6$ esp/ml (Batista, 2003); en general estos datos son más altos que los aportados para el semen de caballo $168,8 \pm 8,6$ (Magistrini y Samper, 2000).

El pH del semen de asno zamorano-leonés se sitúa en nuestro trabajo entre $7,4$ y $8,0$, superior al descrito por algunos autores en otras razas de asnos: $6,83$ según Gokcen y col. (1993) y $7,21\text{-}7,39$ según Morais y col. (1994^a); superior al descrito para caballos: $7,2\text{-}7,4$ (Kenney y col., 1983; Blanchard y Varner, 1996); pero similar al descrito por Gastal y col. (1997): $7,6$, por Henry y col. (1999): $7,4\text{-}7,7$, por Miró y col. (2003^b): $7,66\text{-}8,4$ y por Batista (2003): $7,77$ para semen de burro.

Los valores de motilidad total ($70\text{-}90\%$) y progresiva ($60\text{-}80\%$) son similares a los descritos por otros autores, los cuales son por lo general bastante buenos en todos los estudios, con un rango de 70 a $97,5\%$ de motilidad total y de 70 a $94,2\%$ de motilidad progresiva (Henry y col., 1987^c; Costa y col, 1991^{ab}; Gokcen y col., 1993; Morais y col., 1994^b; Lodi y col., 1995; Santos y col., 1995; Trimeche, 1996^a; Gastal y col., 1997; Boeta y Zarco-Quintero, 2000; Batista, 2003); y semejante a los datos de motilidad descritos para el semen de caballo que oscila entre el 59 y el 74% (Magistrini y col., 1987; Pickett y col., 1975^b, 1993^a; Squires y col, 1979). En nuestro estudio se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la motilidad entre individuos, al igual que ha sido descrito anteriormente por Morais y col. (1994^b) y Gastal y col. (1997).

El porcentaje de formas anormales en nuestro estudio es relativamente bajo (13%) al igual que describen la mayoría de los autores para semen de burro de diversas razas: $14,3\%$

según Nishikawa (1951-citado por Thompson y Evans, 1992), 7.6% según Kreuchauf (1983), 15.4% según Henry y col. (1987^c), 17.3% según Costa y col. (1991^{ab}), 19.0% según Gokcen y col. (1993), 15.6% según Morais col. (1994^b); 14.3% según Gastal y col. (1997) y 19% según Batista (2003). Las anomalías más frecuentemente observadas por nosotros son las del flagelo y después las de la pieza intermedia, anomalías frecuentemente encontradas también por otros autores para semen de burro (Henry y col., 1991; Morais y col., 1994^b; Santos y col., 1995; Gastal y col., 1997; Silva y col., 1997; Mello y col., 2000; Batista, 2003).

En nuestro estudio sólo un animal, Jeicho, presentó diferencias significativas en el porcentaje de morfoanomalías espermáticas, debido a un gran número de formas anormales en la pieza intermedia, ésto hace que el porcentaje de morfoanomalías mayores también sea mayor que el del resto de la muestra. Por otro lado, Jeicho además presentó diferencias significativas en cuanto a la motilidad espermática; en caballos está descrito que en el inicio de la degeneración testicular los parámetros de motilidad y morfoanomalías están alterados (Blanchard y col., 1993); posiblemente ésto podría estar ocurriendo en el caso de Jeicho ya que es el animal de mayor edad del estudio. Gerineldo presentó también un gran número de morfoanomalías del tracto intermedio y del porcentaje de morfoanomalías mayores que es mayor que el del resto de la muestra, sin embargo, el número total de espermatozoides con morfología normal no fue distinto al resto de los animales.

El número total de espermatozoides con motilidad progresiva y morfológicamente normales por eyaculado en nuestro estudio presentó un rango muy amplio ($2.5-25.6 \times 10^9$), al igual que en trabajos anteriormente publicados por otros autores: $8.7-31.2 \times 10^9$ esp/eyaculado según Santos y col. (1995), $1.7-19.3 \times 10^9$ esp/eyaculado según Henry y col. (1991), $5.8-13.3 \times 10^9$ esp/eyaculado según Gastal y col. (1997), $0.9-6.8 \times 10^9$ esp/eyaculado según Henry y col. (1999) y de 8 a 18.5×10^9 esp/eyaculado según Miró y col. (2003^b).

Mozo es el único animal que presentó un número total de espermatozoides en el eyaculado significativamente menor que el resto de la muestra, ésto es debido a un volumen de eyaculado muy bajo (20ml); posiblemente como consecuencia de que el animal sólo tiene 2

años, es el animal más joven del estudio. Sin embargo, la buena calidad del resto de los parámetros resultó en un NTMP y NTMPN semejantes al del resto de los individuos.

Trimeche (1996^a) evalúa la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de burro mediante test hiposmótico en el semen fresco siendo la reacción a este test del 73,6%; similar al observado en nuestro estudio 64,3% (31-93%). En contra Batista (2003) aporta datos de test hiposmótico de semen fresco de asno Catalán mucho más bajos (24%) y muy variable entre individuos, la causa de esta diferencia podría ser debida a que la metodología usada por Batista difiere de la utilizada por nosotros y por Trimeche, ya que el tiempo de incubación es menor (20 minutos frente a 60), y posteriormente la muestra es sometida a una centrifugación y una tinción.

El porcentaje de acrosomas intactos en semen fresco de burro en trabajos anteriormente publicados fue del 98% según Silva y col. (1997) y del 98,7% según Trimeche (1996^a); en nuestro estudio este porcentaje de acrosomas intactos es menor (82,68%). Esta diferencia puede ser debida a las diferentes técnicas utilizadas en cada trabajo, Silva utilizó tinción Karras, Trimeche usó fluorescencia (PSA) y nosotros hemos utilizado tinción Spermac.

La tinción del acrosoma y el test hiposmótico son pruebas de fácil realización y evalúan importantes atributos de la membrana del espermatozoide y en nuestra opinión deben incluirse en los exámenes andrológicos rutinarios.

En este estudio existe una gran homogeneidad en cuanto a la calidad del semen (pH, MT, MP, A, HOS), pero una gran variabilidad en cuanto a la cantidad (Vo, NT, NTMP y NTMPN); la gran diferencia que existe entre eyaculados hace que estos parámetros en general no hayan resultado significativamente diferentes entre individuos.

Los valores seminales de este estudio son similares a los publicados por nuestro equipo realizados con 100 eyaculados de garañones de raza Zamorano-Leonesa (Crespo y col. 2003).

5.2. Experiencia 2. Efecto del plasma seminal, del diluyente y de la temperatura de conservación en la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides del asno de raza Zamorano-Leonesa.

Según nuestros resultados la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación permite alargar la vida de los espermatozoides durante la refrigeración; con el uso de vagina artificial abierta también se puede prolongar la vida útil de los espermatozoides aunque en menor medida, probablemente debido a que la eliminación del plasma seminal es incompleta. Esta influencia negativa del plasma seminal en la refrigeración ya ha sido descrita para el semen de caballo en numerosos estudios (Pickett y Amann, 1987; Varner y col., 1987^a; Jasko y col., 1991; Brinsko y col., 2000; Dawson y col., 2000); estos autores recomiendan una mayor dilución del semen para minimizar estos efectos negativos o centrifugar el semen y retirar parcialmente el plasma seminal antes de su refrigeración, para incrementar la motilidad del semen refrigerado de aquellos sementales “malos refrigeradores” (Brinsko y col., 2000; Dawson y col., 2000; Keller y col., 2001). En nuestro estudio la centrifugación permite un mayor tiempo de conservación del semen de burro refrigerado independientemente del diluyente empleado y por otro lado la refrigeración de la fracción rica en espermatozoides recogida mediante vagina abierta también permite un mayor tiempo de conservación que la refrigeración del eyaculado completo sin centrifugar. Estos resultados contrastan con los publicados por Ferreira y col. (1991) y Mello y col. (2000) y por contra coinciden con los estudios de Miró y col. (2003^c).

Ferreira y col. (1991) sólo encontró mejores resultados de motilidad en la refrigeración a 5°C del semen de burro cuando retiraba el plasma seminal mediante centrifugación en los diluyentes con yema de huevo pero no en los diluyentes con leche. Mello y col. (2000) estudian el efecto del plasma seminal en la conservación del semen utilizando eyaculados completos y eyaculados recogidos con vagina abierta, sin encontrar diferencias significativas en cuanto a la longevidad de estos eyaculados conservados a 5°C durante 11 días. Miró y col. (2003^c) sin embargo, encontraron mayores índices de supervivencia en la refrigeración (entre 4 y 7° C) del semen de Garañón Catalán cuando diluían mucho el semen (1:10) ó cuando lo centrifugaba.

En nuestro estudio, independientemente de la temperatura de conservación y del método de recogida, el único diluyente con yema de huevo ha resultado peor conservante del semen que los tres sin yema de huevo, otros autores (Mello y col., 2000; Cottorello y col., 2000) por el contrario encontraron que los diluyentes con alguna proporción de yema de huevo aportan mejores resultados que los diluyentes con leche y sin yema de huevo. En nuestro trabajo el diluyente que mayor tiempo ha conservado el semen ha sido el **INRA 82** y aunque en menor medida, el Kenney y la Leche son buenos conservantes del semen a temperaturas de refrigeración; otros trabajos utilizan estos diluyentes para refrigerar semen de burro con buenos resultados de calidad y fertilidad (Santos y col., 1995; Boeta y Zarco-Quintero, 2000; Miró y col., 2003^c).

La temperatura ambiente no es adecuada para la conservación de semen de asno Zamorano-Leonés ya que la motilidad progresiva es menor del 30% a las 24 horas, otros autores ya habían observado este fenómeno en otras razas de burro (Santos y col., 1995) y en caballos (Varner y col., 1988; Douglas-Hamilton y col., 1984). En nuestro estudio hemos comprobado que la motilidad del semen refrigerado se mantiene por igual tanto a 4°C como a 15°C, mientras que la integridad de la membrana plasmática se conserva mejor a 15°C. Magistrini y col., (1992^a) y Battelier y col. (1998) ya observaron que el semen de caballo refrigerado a 15°C conserva mejor la integridad de la membrana plasmática por lo que concluyeron que a esta temperatura el efecto del choque frío es menor que a 4°C, estos autores obtuvieron buenos índices de fertilidad tras inseminar con semen refrigerado a 15°C durante 24 ó 72 horas en un diluyente a base de derivados de la leche. Cottorello y col. (2002) realiza un estudio con semen de burro recogido con vagina abierta y refrigerado a 0°C, a 5°C ó a 10°C y concluyó que la temperatura de 10°C es la que peor conservaba la motilidad del semen de burro cuando el diluyente contenía yema de huevo mientras que no encontró diferencias significativas cuando el diluyente fue Kenney, pero en este estudio no evalúa sin embargo la integridad de la membrana plasmática.

Cuando hemos comparado los 36 tratamientos entre sí, hemos obtenido un tiempo medio de conservación de 90 horas con una motilidad progresiva superior al 30% cuando el semen era recogido con vagina cerrada, centrifugado, diluido en INRA 82 y conservado a una

temperatura de 4 °C (CC x l x 4); y un segundo grupo de tratamientos (CC I 4; CC I 15; CC K 4; CC K 15; CC L 4; AA I 4; AA I 15) que conservan la motilidad progresiva por encima del 30% durante un periodo de entre 56 y 67.8 horas, lo que permitiría transportar el semen hasta donde se encuentre la hembra para su inseminación.

En los siete tratamientos que permiten un mayor tiempo de conservación de la motilidad progresiva se ha eliminado el plasma seminal ya sea por medio de la centrifugación (**CC**) del eyaculado completo como por la recogida de semen con vagina abierta (**AA**) y la temperatura de conservación era 4°C ó 15°C. Como ya hemos expuesto anteriormente existe bibliografía sobre el efecto negativo del plasma seminal en la longevidad del semen refrigerado tanto de burro como de caballo, así como del efecto beneficioso de la refrigeración del semen para su conservación.

Cuando estudiamos la calidad del semen a lo largo del tiempo en los siete mejores tratamientos podemos observar cómo las mayores diferencias no se encuentran en la motilidad sino en la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide; a partir de las 12 horas de conservación destacan significativamente los mejores resultados de integridad de la membrana plasmática en dos tratamientos; los eyaculados completos-centrifugados y los eyaculados recogidos con vagina abierta diluidos en INRA 82 y conservados a 15°C (**CC I 15** y **AA I 15**). En general la conservación de la integridad de la membrana plasmática es mejor a la temperatura de **15°C**. Al igual que el equipo de Magistrini (Batellier y col., 1998, 2001) creemos que a la temperatura de 15°C se podrían minimizar los cambios de la membrana asociados a las bajas temperaturas. Cottorello y col. (2002) comparando sólo motilidad y con diluyente Kenney, no encuentra diferencias muy marcadas entre temperaturas; pero no evalúa otros parámetros como la integridad de la membrana plasmática.

Los datos de motilidad obtenidos por nosotros a lo largo del tiempo: entre el 46% y el 57% de motilidad progresiva a las 24 horas y entre el 31% y el 42% a las 48 horas, en los siete mejores diluyentes, son parecidos e incluso superiores a los encontrados por otros autores (Kreuchauf, 1983; Santos y col., 1995; Cottorello y col., 2002). Cottorello y col. (2002) obtienen

datos de motilidad progresiva muy pobres con el diluyente Kenney (30% a las 24 horas y 15% a las 48%) mientras que Santos y col. (1995) encuentra motilidad progresiva mayor al 40% a las 48 horas de almacenamiento a 4°C con este mismo diluyente y Mello y col. (2000) observaron motilidad progresiva a las 24 horas de entre el 48% y el 69% y a las 48 horas entre 30% y 64%.

Cuando se utiliza el mismo diluyente, en este caso INRA 82, la longevidad de los eyaculados completos-centrifugados (67 horas a 15°C ó 90 horas a 4°C) tiende a ser mayor que la de los eyaculados recogidos con vagina abierta (56 h a 15°C ó 61 h a 4°C) y mayor que los eyaculados completos sin centrifugar (48h a 15°C ó 43 h a 4°C). En contra algunos autores (Jasco y col., 1992^a; Rigby y col., 2001) señalan la necesidad de retener parte del plasma seminal para mejorar las características de motilidad de los espermatozoides de caballo en refrigeración; igualmente Mello y col. (2000) no encontraron diferencias significativas en cuanto a la longevidad de eyaculados completos o eyaculados recogidos con vagina abierta conservados a 5°C durante 11 días en medio Kenney. En nuestro estudio cuando utilizamos diluyente Kenney y temperatura de conservación de 4°C hemos encontrado diferencias significativas aún más marcadas entre los métodos de recogida: 64 horas en eyaculados completos-centrifugados y 53 horas con eyaculados recogidos con vagina abierta frente a las 31 horas de conservación cuando se refrigera el eyaculado completo.

Cuarenta y ocho horas es tiempo suficiente como para poder transportar el semen para su inseminación artificial (Picket, 1995), en este estudio el semen de burro zamorano-leones refrigerado a 15°C y diluido en INRA 82 en ausencia de plasma seminal puede mantener su viabilidad por un periodo cerca de las 60 horas, con buenas características de motilidad e integridad de la membrana plasmática.

5.3. Experiencia 3. Efecto del diluyente y del tipo y de la concentración de crioprotector en la congelación de los espermatozoides de asno de raza Zamorano-Leonesa.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en la motilidad total y progresiva inmediatamente tras la descongelación con el uso de diferentes diluyentes; pero observamos que la motilidad progresiva media de los eyaculados congelados con glicerol como crioprotector es superior al 30%; aunque en alguno de los tratamientos congelados con etilenglicol su motilidad progresiva no es estadísticamente menor que en los congelados con glicerol, la motilidad progresiva media de los tratamientos que usan etilenglicol fue inferior al 30%. La motilidad no se ve alterada por la concentración de crioprotector cuando evaluamos el mismo diluyente y el mismo crioprotector.

Trimeche (1996^a) introduce una serie de modificaciones en el diluyente INRA 82 para la congelación de semen de burro desarrollando el diluyente T2-94; con él consigue una motilidad total en la descongelación del 53.4% y una motilidad progresiva del 30%; en nuestro estudio conseguimos motilidades progresivas en diluyente SMEY con glicerol del 36.5% y del 37.6%; similar a la obtenidos por Silva y col. (1997) (30-40%) en un estudio comparativo de dos sistemas de envasado para la congelación de semen de burro.

En nuestro estudio los tratamientos en los que se empleó etilenglicol como crioprotector han presentado peores resultados en cuanto a la motilidad en la descongelación cuando los comparamos con los tratamientos que usan glicerol. Alvarenga y col. (2000^a) encontraron diferencias significativas en la motilidad del semen descongelado de caballo cuando comparaban el uso del 5% de glicerol y de diferentes concentraciones de etilenglicol, siendo mayor la motilidad del semen congelado con un 5% de etilenglicol, pero en un segundo experimento del mismo artículo no encontraron diferencias significativas cuando utilizan 5% de glicerol y 5% de etilenglicol en distintos envases; similar es lo observado por Henry y col. (2002) que no encontraron diferencias significativas en la motilidad del semen congelado-descongelado de caballo con un 5% de glicerol o con varias concentraciones de etilenglicol.

Trimeche (1996^a) en un experimento en el que evalúa diferentes concentraciones de glicerol para la congelación de semen de asno del Poitou obtiene mayor motilidad total cuando la concentración de glicerol es del 4%; la motilidad total (entre 42.9% y 45.7%) obtenida en nuestro estudio para los eyaculados congelados con glicerol es mayor a la encontrada por Trimeche (<30%) en dicho experimento. Vidament y col. (2001) estudiando varias proporciones de glicerol (entre 1.5 - 4.5%) para la congelación de semen equino encontraron un aumento visible, aunque no significativo, en la motilidad del semen descongelado cuando utilizaban concentraciones entre 2.4 - 2.8% de glicerol.

Sí encontramos diferencias significativas en las características del movimiento inmediatamente después de la descongelación cuando comparamos los diluyentes, con el diluyente BURNS obtuvimos en todos sus casos peores características de la motilidad (VCL, VSL, VAP, LIN y STR) que con el diluyente SMEY.

En nuestro trabajo para los eyaculados congelados con SMEY los datos obtenidos en cuanto a la calidad del movimiento inmediatamente tras la descongelación son altos (VCL: 70.8-77 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VSL: 54.1 - 61.6 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VAP: 59.5 - 67.7 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y LIN: 72.3 - 79% y STR: 88.1 - 90.7%); similares a los obtenidos por Trimeche (VCL: 69 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VSL: 62.4 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VAP: 64.4 $\mu\text{m}/\text{seg}$; LIN: 81.5%) cuando utiliza T2-94 en la congelación de semen de burro (Trimeche, 1996^a) y mayores a los obtenidos en semen fresco para el garañón catalán por Batista en 2003 (VCL: 80.20 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VSL: 49.80 $\mu\text{m}/\text{seg}$; VAP: 59.39 $\mu\text{m}/\text{seg}$; LIN: 60.50%; STR: 79.21%)

En nuestro estudio los análisis de calidad del movimiento inmediatamente después de la descongelación, cuando utilizamos el mismo diluyente y el mismo crioprotector, no muestran diferencias significativas relacionadas con la concentración del crioprotector. Trimeche (1996^a) evaluando diferentes concentraciones de glicerol para la congelación de semen de asno del Poitou, aunque encuentra mayor motilidad total cuando la concentración de glicerol es del 4%; no encuentra diferencias significativas en cuanto a la calidad del movimiento (VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, % progresivos ondulantes).

Los resultados de integridad de la membrana plasmática de nuestro estudio (19.5% - 27.1%) son inferiores a los aportados por Trimeche (1996^a): 64,8%, pero muy similares a los obtenidos por Henry y col. (2002) para semen congelado-descongelado de caballo: 12-28.7%.

La integridad de la membrana plasmática del semen inmediatamente tras la descongelación es mayor en los tratamientos que utilizan glicerol frente a los tratamientos que utilizan etilenglicol, aunque el estudio estadístico no refleje para todos ellos diferencias significativas; sin embargo, Henry y col. (2002) cuando compararon la acción del glicerol como crioprotector frente a varias concentraciones de etilenglicol observaron un menor porcentaje de integridad de la membrana plasmática con el glicerol pero tampoco encontraron diferencias significativas.

El porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma intacto analizados mediante citometría de flujo inmediatamente tras la descongelación es menor en aquellos tratamientos que utilizan mayor cantidad de crioprotector; siendo los cuatro mejores tratamientos aquellos que utilizan 2.5% de crioprotector y los cuatro peores aquellos que utilizan 5% de cualquiera de los dos crioprotectores. Creemos al igual que Fahy (1986, 1990) y Hammerstedt y col. (1990) que los agentes crioprotectores presentan ciertos efectos tóxicos sobre los espermatozoides y por tanto el uso de concentraciones altas puede disminuir el porcentaje de células que sobrevivan al proceso de congelación-descongelación.

No hemos encontrado diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma intacto inmediatamente después de la descongelación, entre los dos diluyentes; en nuestro estudio este porcentaje oscila entre el 35.24 y el 45.55%, muy similar a lo observado por otros autores para semen de caballo: 27%-48% según Wilhelm y col. (1996); 44.15% - 51.35% según Medeiros y col. (2002), 26.4% - 39.6% según Henry y col. (2002). En un estudio que evalúa el uso de dos crioprotectores en la congelación de semen de caballo Vidament y col. (2002) obtienen datos de vitalidad de aproximadamente el 73% y de integridad del acrosoma del 72% (52% de vivos con acrosoma intacto); consiguiendo un 51% de fertilidad.

Miró y col. (2003^d) obtienen resultados variables de viabilidad de los espermatozoides de semen congelado-descongelado de garañón Catalán (24% - 60%) dependiendo del animal.

Trimeche (1996^a) obtiene un 95.6% de acrosomas intactos postdescongelación cuando modifica el diluyente INRA 82 para la congelación de semen de asno, esta cifra es muy elevada, pero no evalúa simultáneamente la vitalidad de los espermatozoides; consideramos por ello que la técnica de nuestro estudio más precisa.

Al igual que otros autores (Alvarenga y col., 2000^a; Henry y col. 2002; Vidament y col., 2002; Medeiros y col. 2002) en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en el porcentaje de espermatozoides vivos y con acrosoma intacto inmediatamente después de la descongelación cuando comparamos el uso de los diferentes crioprotectores a la misma concentración.

En el estudio de la longevidad, el semen congelado-descongelado con diluyente SMEY e incubado una hora a 37°C presentan una la motilidad total y progresiva mayor en aquellos tratamientos que usaban glicerol frente a los tratamientos que usaban etilenglicol como crioprotector; y mayor en los tratamientos con 2.5% de crioprotector que en los tratamientos con 5% de crioprotector.

En semen congelado-descongelado con diluyente BURNS e incubado una hora a 37°C se observa mayor motilidad total (MT 1h) en los tratamientos que usan glicerol y mayor motilidad progresiva (MP 1h) en los tratamientos que usan 2.5% de crioprotector. Con este diluyente, BURNS, se observa que las características de la motilidad una hora después de la incubación VSL 1h, VAP 1h, LIN 1h y STR 1h son mayores en los tratamientos que llevan 2.5% de glicerol que en los que llevan 5% de glicerol.

Aunque no siempre existen diferencias estadísticas, sí se puede observar como hay una tendencia a que la motilidad, las características de motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto después de una hora de incubación sea superior en aquellos

tratamientos que, congelados con un mismo diluyente y un mismo crioprotector, llevan menor porcentaje de éste; esto apoyaría la hipótesis de que los agentes crioprotectores presentan efectos tóxicos sobre los espermatozoides (Fahy, 1986, 1990; Hammerstedt y col., 1990).

Al igual que inmediatamente tras la descongelación, después de una hora de incubación las características de la motilidad son mejores en los tratamientos congelados con diluyente SMEY y dentro de estos la linearidad (LIN 1h) es estadísticamente superior en los tratamientos con glicerol.

Para Kenny y col. (1983) y para Thompson y Evans (1992) del semen fresco se pierde la mitad de la motilidad en la primera hora de incubación; en nuestro estudio esta caída de la motilidad con semen congelado-descongelado ha sido inferior. Los datos de la motilidad progresiva después de una hora de incubación para los tratamientos que usan glicerol como crioprotector (19.1% - 26.9%) de nuestro estudio son inferiores a los observados por Silva y col. en 1997 (34%) para semen de burro descongelado incubado a 37°C durante una hora, pero similares a los publicados por otros autores para semen de caballo congelado-descongelado e incubado una hora: 27% según Cochran y col. (1984); 23.7% según Cristanelli y col. (1985); 15-16% según Arns y col. (1987); 19% según Pommer y col. (2003).

Hemos observado que la integridad de la membrana plasmática después de una hora de incubación (HOS 1h) es mayor en los tratamientos con glicerol, los valores obtenidos son menores pero las diferencias significativas son similares a las observadas inmediatamente tras la descongelación. No hemos encontrado diferencias significativas referentes a la concentración de crioprotector o al diluyente en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática en el estudio de la longevidad.

En el análisis con citometría de flujo tras una hora de incubación a 37°C los tratamientos que utilizan SMEY y un 2,5% de crioprotector y los cuatro tratamientos con diluyente BURNS no presentan diferencias estadísticas, presentando un porcentaje de espermatozoides vivos con

acrosoma intacto de entre el 28.39% y el 36.15% similar al aportado por otros autores para semen descongelado de caballo incubado una hora: 28% (Pommer y col., 2003).

Analizando el conjunto de los análisis realizados inmediatamente tras la descongelación observamos que el diluyente **SMEY** ha conservado mejor las características de la motilidad inmediatamente tras la descongelación. Por otro lado, observamos que el **GLICEROL** ha sido el crioprotector con el que obtuvimos mayor porcentaje de motilidad total y progresiva, y con el que hemos mantenido en todos los casos una motilidad progresiva por encima del 30%, aunque no ha sido el que mejor conservó la integridad de la membrana plasmática. Finalmente observamos que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto inmediatamente tras la descongelación aumenta en aquellos tratamientos que congelados con un mismo diluyente y un mismo crioprotector llevan una menor proporción de éste (**2.5%**).

Analizando en conjunto los análisis efectuados tras una hora de incubación del semen descongelado observamos que el diluyente **SMEY** ha resultado el diluyente que mejor ha conservado todas las características de la motilidad; que el **GLICEROL** como crioprotector ha permitido obtener los mejores resultados de motilidad total y progresiva; y mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta. Finalmente observamos que la motilidad, sus características y el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto aumenta en aquellos tratamientos que congelados con un mismo diluyente y un mismo crioprotector llevan una menor proporción de éste (**2.5%**).

Como indican algunos autores para semen de caballo (Amann y Pickett, 1987^b; Graham, 1996^c) la cantidad de crioprotector que se debe emplear es la mínima necesaria para optimizar las posibilidades de supervivencia de las células; por lo que creemos que en nuestro estudio el tratamiento que reúne las mejores características en general para la congelación de semen de asno Zamorano-Leónés es el **SMEY 2.5% GLICEROL**.

Trimeche en las pruebas realizadas *in vivo* con el T2-94 (Trimeche, 1996^a) obtuvo las únicas gestaciones en burras con semen congelado de garañón cuando la concentración de

glicerol era disminuida al 2% mediante dilución tras la descongelación, las características seminales en la descongelación del semen congelado con T2-94 no son superiores a las obtenidas en nuestro trabajo, por lo que creemos que con un sistema de congelación ampliamente estudiado y probado en ganado equino como el SMEY y utilizando directamente una baja concentración de glicerol podríamos obtener resultados de fertilidad similares a los obtenidos para el burro del Poitou.

Por otro lado sabemos que los espermatozoides congelados con glicerol y descongelados son más lábiles que los no procesados y que las membranas celulares quedan de algún modo dañadas (Parrish y Foote, 1986, Graham y Foote, 1987; Parks y Graham, 1992); de hecho, estudios recientes intentan sustituir el glicerol por otros crioprotectores de menor peso molecular que sean menos tóxicos para el espermatozoide. En nuestro estudio el etilenglicol no ha resultado ser un buen crioprotector pero sería muy interesante que futuras investigaciones sobre congelación de semen de burro se centrasen en el estudio de otros crioprotectores.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. En este estudio hemos determinado las características seminales del asno zamorano-leonés, que son similares a las descritas en otras razas de burros.
2. Las grandes diferencias en los parámetros seminales entre eyaculados hacen que no apreciemos diferencias significativas entre individuos. En general, los parámetros relacionados con la calidad del semen (pH, MT, MP, A, HOS) son más homogéneos que los relacionados con la producción (Vo, NT, NTMP y NTMPN).
3. La tinción del acrosoma y el test hiposmótico son pruebas de fácil realización y evalúan importantes atributos de las membranas del espermatozoide de asno y deben incluirse en los exámenes andrológicos rutinarios.
4. El plasma seminal tiene un efecto negativo en la viabilidad del semen refrigerado del burro.
5. El semen de burro pobre en plasma seminal (centrifugado o recogido con vagina abierta), diluido en INRA 82 y refrigerado, mantiene una buena motilidad progresiva durante más de 60 horas.
6. La temperatura de refrigeración de 15°C es la que mejor conserva la integridad de la membrana plasmática de asno.
7. De los crioprotectores utilizados el glicerol es el que conserva mejor la motilidad de los espermatozoides congelados-descongelados.
8. El uso de concentraciones bajas de crioprotector conserva mejor la viabilidad y la integridad de las membranas de los espermatozoides de burro durante la congelación.

9. Con el diluyente SMEY hemos obtenido mejores características cinéticas postdescongelación (VCL, VSL, VAP, LIN, STR) que con el diluyente BURNS.

10. La congelación de semen de asno zamorano-leonés en medio SMEY con un 2.5% de glicerol fue la que permitió obtener las mejores características postdescongelación del semen.



RESUMEN

7. RESUMEN

Hemos realizado este estudio con el fin de determinar los parámetros normales del semen del burro zamorano-leonés; optimizar la metodología de refrigeración de semen y desarrollar un sistema de crioconservación del semen de burro de esta raza. Para ello hemos realizado tres experiencias independientes.

En una primera experiencia evaluamos las características seminales de 38 eyaculados obtenidos de 7 burros zamorano-leoneses para establecer los parámetros de normalidad dentro de la raza. Los valores seminales encontrados en la raza Zamorano-Leonesa son similares a los descritos en otras razas de asnos; presentando gran homogeneidad en los parámetros relacionados con la calidad del semen (pH, MT, MP, A, HOS), pero una gran variabilidad en cuanto a la producción (Vo, NT, NTMP y NTMPN).

En una segunda experiencia realizamos un estudio sobre refrigeración del semen de asno con el fin de establecer las condiciones de recogida y manipulación que permitan la máxima supervivencia de los espermatozoides de asno para su almacenamiento. Evaluamos el “*efecto del plasma seminal*” mediante el estudio de la recogida de semen con vagina cerrada y la posterior eliminación o no del plasma seminal y la recogida de semen con vagina abierta; el “*efecto del diluyente*”, comparando el uso de Leche, Kenney, INRA 82 o TRIS-yema; y el “*efecto de la temperatura de conservación*” utilizando tres temperaturas 20°C, 15°C y 4°C. En esta experiencia encontramos que el plasma seminal tiene un efecto negativo en la viabilidad del semen refrigerado del burro, que el uso del diluyente INRA 82 para la refrigeración de semen en ausencia de plasma seminal puede mantener su viabilidad por un periodo amplio de tiempo, superior a las 60 horas y finalmente el método de conservación de semen a 15°C en condiciones aeróbicas conservó mejor la integridad de la membrana plasmática.

En una tercera experiencia intentamos establecer una técnica de crioconservación de semen de asno que permita obtener la máxima calidad del semen de asno tras su descongelación. Con este fin evaluamos el “*efecto del diluyente*” usando BURNS y SMEY; y el

“efecto del tipo y concentración de crioprotector” usando dos crioprotectores: etilenglicol y glicerol, cada uno de ellos a dos concentraciones distintas 2.5% y 5%. Observamos que el glicerol es mejor crioprotector en la congelación de semen de burro zamorano-leonés que el etilenglicol; la concentración de 2.5% de crioprotector independientemente del diluyente y del tipo de crioprotector ha sido más efectiva que el 5%; y que la congelación de semen de asno zamorano-leonés con SMEY 2.5% GLICEROL, permite obtener las mejores características postdescongelación para ser utilizado en la inseminación artificial.

7.1. Summary

The aims of this study are the establishment of the normal seminal parameters of the zamorano-leonés donkey, the improvement of the cooled semen technology and the development of a protocol for the cryopreservation of semen for this endangered breed of asses. We have carry out three different experiments:

In the first experience we evaluated the seminal characteristics of 38 ejaculates from 7 zamorano-leonés jackasses to establish the normal parameters for that breed. The seminal characteristics for the zamorano-leonés donkey breed are similar to those described for other donkey breeds; the parameters related to semen quality (pH, MT, MP, A, HOS) are more homogeneous than those related to quantity (Vo, NT, NTMP y NTMPN).

The second experience was an study about cooled semen in which we evaluate the collection and manipulation conditions that allowed the maximal survival of the donkey spermatozoa during storage. To evaluate the effect of seminal plasma we collect the semen with a closed artificial vagina and then eliminate or not the seminal plasma or we used an open-ended artificial vagina; to evaluate the effect of the extender we compared the use of skimmed-milk, Kenney, INRA 82 or TRIS-yolk; and to evaluate the effect of the temperature we used three store temperatures: 20°C, 15°C and 4°C. We found that seminal plasma has a deleterious effect on viability of donkey cooled semen; that the use of INRA 82 extender without seminal plasma allow for an extended storing period, longer than 60 hours, and that keeping the semen at 15°C under aerobic conditions allowed a better maintenance of the plasma membrane integrity.

For the third experience we try to establish the freezing protocol that allow the higher post-thaw quality for donkey semen. We evaluate the effect of the extender using two freezing media: BURNS and SMEY, and the effect of the kind and concentration of the cryoprotectant by using two cryoprotectants: ethylene-glycol and glycerol at two different concentrations: 2.5% and 5%. We could confirm that glycerol is a better cryoprotectant for donkey semen that ethylene-glycol and that a low concentration of cryoprotectant (2.5%), independent of the extender and

cryoprotectant used, is more effective for freezing than the 5% concentration. The use of SMEY medium with 2.5% glycerol allowed us to obtain the best post-thaw quality of zamorano-leonés donkey semen for its use in artificial insemination programs.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Allen, W.E. (1988).** Fertility and Obstetrics in the Horse. Blackwell Scientific Publications. Blackwell Scientific Publications; Oxford; UK.
2. **Alvarenga, MA; Landim-Alvarenga, FC; Moreira, RM; Cesarino, MM. (2000^a).** Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging. *Equine Veterinary Journal*, 32: 6, 541-545.
3. **Alvarenga, MA; Graham, JK; Keith, SL; Landim-Alvarenga, FC; Squires, EL. (2000^b).** Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14 th International congress on Animal Reproduction*. Stockholm. Volume 2, 157.
4. **Amann, R.P.; Thompson, D.L.; Squires, E.L.; Pickett, B.W. (1979).** Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27: 1-6.
5. **Amann, R.P. (1981).** A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. of Androl.* 2: 37-58.
6. **Amann, R.P.; Cristanelli, M.J.; Squires, E.L. (1987^a).** Proteins in stallion seminal plasma. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35: 113-120.
7. **Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1987^b).** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Eq. Vet. Sci.* 7: 145-173.
8. **Amann, R.P. (1989).** Can the fertility of a seminal sample be predicted accurately? *J. of Androl.* 10 (2): 89-98.
9. **Amann, R.P., Jasko, D.J.; Kayser, P.; Moran, D. (1992).** The responses of spermatozoa to cooling and rates of cooling. En: *Techniques of Handling and Utilization of Transported Equine Spermatozoa and Embryos*. 1992 Proceedings. Colorado State University.
10. **Amann, R.P.; Graham, J.K. (1993^a).** Spermatozoal function. En: *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
11. **Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. (1993^b).** In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *J. Androl.* 14 (6): 397-406.

12. **Amann, R.P. (1993^c)**. Effects of drugs or toxins on spermatogenesis. En: Equine Reproduction. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
13. **Anchordoguy, TJ; Rudolph, AS; Carpenter, JF; Crowe, JH. (1987)**. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*; 24(4): 324-31.
14. **Anderka, K.; Plante, C. (1995)**. The use of different processing treatments and their effect on post-thaw motility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, Volume 43, Issue 1, Page 159.
15. **Anuario Estadístico Agrario (1997)**. MAPA. (R.D 1682/1997)
16. **Arns, MJ; Webb, GW; Kreider, JL.; Potter, GS; Evans, JW. (1987)**. Use of different nonglycolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37°C and 5°C in a bovine serum albumin medium. *J. Reproduction Fertility. Suppl 35*, 135-141.
17. **Auger, X. Ronot, and J. P. Dadoune (1989)**. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl.*; 10: 439-448.
18. **Aurich, J.E.; Kühne, A.; Hoppe, H.; Aurich, C. (1996)**. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Therio 46*: 791-797.
19. **Aurich, J.E.; Schönherr, U.; Hoppe, H.; Aurich, C. (1997)**. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Therio 48*: 185-192.
20. **Ball, B.A.; Mohammed, H.O. (1995)**. Morphometry of stallion spermatozoa by computer assisted image analysis. *Therio 44*: 367-377.
21. **Ballachey, BE; Evenson, DP; Saacke, RG. (1988)**. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl.*;9(2):109-15.
22. **Barbacini, S., Marchi, V., Zavaglia, G. (1999)**. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994–1997 period. *Equine Vet. Educ.* 11 (2), 109–112.
23. **Barker, C.A.V.; Gandier, J.C.C. (1957)**. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can. Med. Vet. Sci.*, 21, 45-51.

24. **Batellier F.; Duchamp, G.; Vidament, V.; Arnaud, G.; Palmer, E.; Magistrini, M. (1998).** Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh semen at 15 °C under aerobic conditions. *Theriogenology*, 50: 229-236.
25. **Batellier, F; Vidament, M; Fauquant, J; Duchamp, G; Arnaud, G; Yvon, JM; Magistrini, M; Squires, EL. (2001).** Advances in cooled semen technology. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 181-190.
26. **Batista, VL (2003).** Comportamiento sexual y normalización de las características seminales del burro Catalán. Tesis de Master. Instituto Agronómico Mediterraneo de Zaragoza. 74 pp.
27. **Baust, JG. (1973).** Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. *Cryobiology*. 1973 Aug;10(3):197-205.
28. **Bedford, S.J.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Amann, R.P.; Squires, E.L.; Pickett, B.W. (1995).** Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Therio* 43: 955-967.
29. **Berndtson, W.E.; Hoyer, J.H.; Squires, E.L.; Pickett, B.W. (1979).** Influence of exogenous testosterone on sperm production, seminal quality and libido of stallions. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 27: 19-23.
30. **Betsch, J.M. (1992).** Sémiologie de l'étalon subfertile. *Rec. Méd. Vét. Spécial Reproduction des Equidés*: 1053-1068.
31. **Bielanski, W. (1975).** The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 19-24.
32. **Bielanski, W.; Kaczmariski, F. (1979).** Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27: 39-45.
33. **Bielanski, W.; Dudek, E.; Bittmar, A.; Koskiniak, K. (1982).** Some characteristics of common abnormal forms in highly fertile stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 19-24
34. **Blach, E.L.; Amann, R.P.; Bowen, R.A.; Sawyer, H.R.; Hermenet, M.J. (1988).** Use of a monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm. *Gam. Res.* 21: 233-241.

35. **Blach, E.L.; Amann, R.P.; Bowen, R.A.; Frantz, D. (1989).** Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Therio* 31 (2): 283-298.
36. **Blanchard, TL; Varner, DD.; McKinnon, AO. (ed.); Voss, JL. (ed.) (1993).** Testicular degeneration. En: *Equine reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
37. **Blanchard, TL; Varner, DD. (1996).** Evaluating breeding soundness in stallions - 2: semen collection and evaluation. *Veterinary-Medicine*, 91: 2, 144-155.
38. **B.O.C. y L. de 23 de noviembre (1998).** N° Boletín: 225 / 1998 ORDEN de 30 de octubre de 1998, de la Consejería de Agricultura y Ganadería, por la que se crea el Libro de Registro Genealógico de la Raza Asnal Zamorana-Leonesa y se aprueba su funcionamiento.
39. **Boeta, M.; Zarco-Quintero, L. (2000).** Ultrapasteurized non-fat milk as a diluent for refrigerated donkey semen for the insemination of mares. *Veterinaria-Mexico*, 31: 1, 67-69.
40. **Borg, K.; Colenbrander, B.; Fazelli, A.; Parlevliet, J.; Malmgrem, L. (1997).** Influence of thawing method on motility and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Therio* 48: 531-536.
41. **Boyer, SP; Davis, RO; Katz, DF. (1989).** Automated semen analysis *Curr Probl Obstet Gynecol*. 12: 167-200.
42. **Boyle, M.S. (1996).** Artificial insemination: assessing stallion seminal quality after freezing. *E. Vet. J.* 28 (1): 5-6.
43. **Brackett, B.G.; Cofone, M.A.; Boice, M.L.; Bousquet, D. (1982).** Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion. *Gam. Res.* 5: 217-227
44. **Braun, W.F. (1986).** Physical examination and genital diseases of the stallion. En: *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. D.A. Morrow, W.B. Saunders, Philadelphia.
45. **Braun, W. (1989):** Determining fertility in stallions. *Vet. Med.* Feb 192-199.
46. **Braun, J; Sakai, M; Hochi, S; Oguri, N. (1994).** Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41: 4, 809-818.
47. **Brinsko, SP; Crockett, EC; Squires, EL. (2000).** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54: 1, 129-136.

48. **Brinsko, SP; Blanchard, TL; Rigby, SL; Love, CC; Varner, DD. (2003).** Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, 59: 3-4, 735-742.
49. **Bristol, F. (1982).** Breeding behaviour of a stallion at pasture with 20 mares in synchronized oestrus. *Equine reproduction, III. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 32*, 71-77.
50. **Bristol, F. (1987).** Fertility of pasture bred mares in synchronized oestrus. *Journal-of-Reproduction-and-Fertility. Supplement 35*, 39-43.
51. **Burns, PJ; Reasner, DS. (1995).** Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 15: 9, 377-380.
52. **Busson, H.; Chanteloube, P.; Magistrini, M.; Palmer, E. (1987).** Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 25-31.
53. **Caiza de la Cueva, F.I.; Rigau, T.; Bonet, S.; Miró, J.; Briz, M.; Rodríguez-Gil, J.E. (1997).** Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: Effects of ouabain. *Therio* 47: 765-784.
54. **Carver; DA.; Ball, BA. (2002).** Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology*, 5: 8,1587-1595.
55. **Casey, P.J.; Hillman, R.B.; Robertson, K.R.; Yudin, A.I.; Liu, I.K.M.; Drobnis, E.Z. (1993).** Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.* 14 (4): 289-297.
56. **Casey, PJ; Gravance, CG; Davis, RO; Chabot, DD; Liu, IKM. (1997).** Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 47: 2, 575-582
57. **Christensen, P.; Parlevliet, J.M.; Van Buiten, A.; Hyttel, P.; Colenbrander, B. (1995):.** Ultrastructure of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Biol. of Reprod. Mono* 1: 769-777.
58. **Clayton, H.M.; Lindsay, F.E.F.; Forbes, A.C. Hay, L.A. (1981).** Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. *Appl. Anim. Ethol.* 7, 169-174.

59. **Clément, F.; Vidament, M.; Magistrini, M. (1992).** Estimation du pouvoir fécondant de l'étalon. Rec. Méd. Vét. Spécial Reproduction des Equidés : 947-957.
60. **Clément, F; Ladonnet, Y; Magistrini, M. (2001^a).** Sperm morphology and fertility. Animal Reproduction Science, Volume 68, Issues 3-4, Pages 362-363.
61. **Clément, F (2001^b).** La reproduction chez l'âne. Equ'Idée; Volume 40, Pages 4-5.
62. **Cochran, JD; Aman, RP; Squires, EL; Pickett, BW (1983).** Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. Theriogenology, 20: 6, 735-741.
63. **Cochran, JD; Amann, RP; Froman, DP; Pickett, BW (1984).** Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. Theriogenology, 22: 1, 25-38.
64. **Costa, A.J.; Vale Filho, V.R.; Leite, S.V. (1991^a).** Andrological evaluation and semen evaluation in Northeastern donkeys in Paraíba State. IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil. (medline)
65. **Costa, A.J.; Vale Filho, V.R.; Souto, N.B.; Ribeiro, E.A. (1991^b).** Andrological evaluation of Pega donkeys (*Equus asinus*) in 3 areas in Minas Gerais and Bahia. IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil. (medline)
66. **Cottorello, ACP; Amancio, RC; Henry, M; Borges, I; Evans, MJ. (ed.) (2002).** Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. Theriogenology, 58: 2-4, 325-328.
67. **Crespo, F.; Álvarez, AL.; Benito, D.; Mateos, E.; Gómez-Cuétara, C.; Serres, C. (2003)** Caracterización de los parámetros seminales en el asno Zamorano-leones. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal.. Araucas (Las Palmas) 84.
68. **Cristanelli, M.J.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1984).** Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. Therio 22 (1): 39-45.
69. **Cristanelli, MJ; Amann, RP; Squires, EL; Pickett, BW (1985).** Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology, 24: 6, 681-686.

70. **Crockett, EC; Graham, JK; Bruemmer, JE; Squires, EL. (2001).** Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology*, 55: 3, 793-803
71. **Cross, N.L.; Morales, P; Overstreet, J.W; Hanson, FW. (1986).** Two simple methods for detecting acrosoma-reacted human sperm. *Gamete Reseach*. 15, 213-226
72. **Cross, N.L.; Meizel, S. (1989).** Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. of Reprod.* 41: 635-641.
73. **Davis, R.O.; Gravance, C.G.; Casey, P.J. (1993).** Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1808-1811.
74. **Dawson, GR; Webb, GW; Pruitt, JA; Loughin, TM; Arns, MJ (2000).** Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa. *Journal-of-Equine-Veterinary-Science.*, 20: 3, 191-194.
75. **Dell'aqua Jr., J.A.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A.; Zahn, F.S. (2001).** Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 324-325.
76. **Demick, D.S.; Voss, J.L.; Pickett, B.W. (1976).** Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *J. Anim. Sci.* 43: 633-637.
77. **Denis, B. (1995).** Étude zootechnique de l'Âne en France: aspects historiques. *Ethnozootechnie* n° 56: 27-43.
78. **Didion, B.A.; Dobrinsky, J.R.; Giles, J.R.; Graves, C.N. (1989).** Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gam. Res.* 22: 51-57.
79. **Dott, H.M. (1975).** Morphology of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 41-46.
80. **Douglas-Hamilton, D. H.; Osol, R.; Osol, G.; Driscoll, D.; Noble H. (1984).** A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*, Volume 22, Issue 3 , September 1984, Pages 291-304
81. **Dowsett, KF.; Pattie, WA. (1982).** Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32: 1-8.

82. **Drobnis, E.Z.; Crowe, L.M.; Berger, T.; Anchordoguy, T.J.; Overstreet, J.W.; Crowe, J.H. (1993).** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J. Exper. Zool.* 265: 432-437.
83. **Ecot, P.; Vidament, M.; de Mornac, A.; Perigault, K.; Clément, F.; Palmer, E.; (2000).** Stallion frozen semen: interactions between cooling procedures, extenders and stallion. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 56, 141–150.
84. **Ecot, P; Arnaud, G; Moy, A; Daels, P; Magistrini, M; Vidament, M. (2001).** Comparison of fertility and post-thaw semen criteria of stallion semen frozen in two different extenders. *Animal Reproduction Science*, Volume 68, Issues 3-4, Pages 356-357.
85. **El-Wishy, AB. (1974).** Testicular and epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). *Zeitschrift-fur-Tierzuchtung-und-Zuchtungsbiologie*, 91: 4, 334-344(med-line)
86. **El-Wishy, AB. (1975).** Morphology of epididymal spermatozoa in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). *Zeitschrift-fur-Tierzuchtung-und-Zuchtungsbiologie*. 92: 1-2, 67-72. (med-line)
87. **Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. (1982).** Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem.*;30(3):279-80.
88. **Evenson, DP. (1990).** Flow cytometric analysis of male germ cell quality. *Methods Cell Biol.*;33:401-10
89. **Evenson, D.P.; Sailer, B.L.; Jost, L.K. (1995).** Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: Implications for fertility and embryo viability. *Biol. Reprod. Mono* 1: 655-659.
90. **Fahy GM. (1986).** The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*;2 3(1): 1-13.
91. **Fahy, GM; Lilley, TH; Linsdell, H; Douglas, MS; Meryman, HT. (1990).** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Review. *Cryobiology*; 27(3): 247-68.
92. **Farlin, M.E.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (1992).** Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. and Dev.* 32: 23-27.
93. **Ferreira, MF.; Jones, DN.; Goncalves, A. (1991).** Effect of centrifugation and diluent on storage of cooled donkey semen. IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil.

94. **Ferreira, MF; Henry, M. (1992).** Effect of cooling rates and seminal extender on sperm longevity and fertility in donkeys. Proc. 10th Int Cong Anim Reprod and Artif Insem 1406-1408.
95. **Fielding, D. (1988).** Reproductive characteristics of the jenny donkey- equus asinus: a review. Trop. Anim. Hlth. Prod. 20: 161-166.
96. **Francl, AT.; Amann, RO. (1987).** Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. Therio 27 (3): 517-525.
97. **Gahne, S; Ganheim, A; Malmgren, L. (1998).** Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. Theriogenology;49(5):1071-4.
98. **Garde, J. (1992).** Congelacion de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
99. **Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A.; Pace, M.M. (1986).** Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol. of Reprod. 34: 127-138.
100. **Garner, D.L.; Johnson, L.A.; Yue, S.T. (1994).** Dual DNA staining of bovine sperm viability using SYBER-14 and propidium iodine. J. Androl. 15: 620.
101. **Gastal, MO; Becker, ARCL; Henry, M; Gastal, EL (1991^a).** Effect of season on semen traits in donkeys. Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil, Vol. II. 1991, 451.
102. **Gastal, MO; Becker, ARCL; Henry, M; Goncalves, A (1991^b).** Seasonal effects on the sexual behaviour of male donkeys. Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, Belo Horizonte, Brazil, Vol. II. 1991, 272.
103. **Gastal, M.O.; Henry, M.; Becker, A.R.; Gastal, E.L.; Goncalves, A. (1996).** Sexual behaviour of donkey jacks: influence of eyaculatory frequency and season. Theriogenology, 46: 4, 593-603.
104. **Gastal, M.O.; Henry, M.; Becker, A.R.; Gastal, E.L (1997).** Effect of ejaculation frequency and season on donkey jack semen. Theriogenology. Feb 1997; 47 (3) : 627-638.
105. **Gebauer, M.R.; Pickett, B.W.; Voss, J.L.; Swiestra, E.E. (1974^a).** Reproductive physiology of the stallion: daily sperm output and testicular measurements. JAVMA 165: 711-713.

106. **Gebauer, M.R.; Pickett, B.W.; Swiestra, E.E. (1974^b)**. Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. *J. An. Sci.* 39 (4): 732-736.
107. **Ginther, OJ. (1983)**. Sexual behavior following introduction of a stallion into a group of mares. *Theriogenology* 19: 6, 877-886.
108. **Ginther, OJ.; Scraba, St.; Bergfelt, Dr. (1987)**. Reproductive seasonality of the jenny. *Theriogenology*. 27:587-592.
109. **Gokcen, H; Tumen, H; Dogan, I; Bilgin, B; Sonmez, C; Demirel, M. (1993)**. Semen characters in stallions and donkeys. *Veteriner-Fakultesi-Dergisi,-Uludag-Universitesi*. 12: 1, 65-72 (medline)
110. **Gomes, GM; Jacob, JCF; Medeiros, ASL; Papa, FO; Alvarenga, MA; Evans, MJ. (2002)**. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology.*, 58: 2-4, 277-279.
111. **Gould, J.E.; Overstreet, J.W.; Yanagimachi, H.; Yanagimachi, R.; Katz, D.F.; Hanson, F.W. (1983)**. What functions of the sperm cell are measured by in vitro fertilization of zona-free hamster eggs? *Fert. & Ster.* 40 (3): 344-352.
112. **Graham, E.F.; Schmehl, M.K.L.; Nelson, D.S. (1980)**. Problems with laboratory assays. *Proc Eighth NAAB Tech Conf AI Reprod*: 59-66.
113. **Graham, J.K.; Foote, R.H (1987)**. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
114. **Graham, J.K.; Kunze, E.; Hammerstedt, R.H. (1990)**. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. of Reprod.* 43: 55-64.
115. **Graham, J.K. (1994)**. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Therio.* 41:1151-1162.
116. **Graham, J.K. (1996^a)**. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clinics of N.A.: Equine Practice.* 12 (1) : 119-130.

117. **Graham, J.K. (1996^b)**. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. *Vet. Clinics of N.A.: Equine Practice*. 12 (1): 111-117
118. **Graham, J.K. (1996^c)**. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clinics of N.A.: Equine Practice*. 12 (1) : 119-130.
119. **Graham, J.K. (2000^a)**. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clinics of N.A.: Equine Practice*. 12 (1): 119-130.
120. **Graham, J.K. (2000^b)**. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14 th International congress on Animal Reproduction*. Stockholm. Volume 2, 307.
121. **Graham, JK; Squires, EL. (2001)**. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 239-247.
122. **Gravance, C.G.; Liu, I.K.M.; Davis, R.O.; Hughes, J.P.; Casey, P.J. (1996)**. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J. Reprod. and Fert.* 108: 41-46.
123. **Guay, P; Rondeau, M; Boucher, S. (1981)**. Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. *Equine Vet J.*;13(3):177-82.
124. **Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. (1990)**. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Of Androl.* 11 (1): 73-88.
125. **Hecht., B.S.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (2001)**. Cooling stallion sperm in modified boar semen extenders. *Animal Reproduction Science* Volume 68, Issues 3-4, Pages 135-365.
126. **Heiskanen, M.L.; Huhtinen, M.; Pirhonen, A.; Mäenpää, P.H. (1994^a)**. Insemination results with slow cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta Vet. Scand.* 35: 257-262.
127. **Heiskanen, M.L.; Huhtinen, M.; Pirhonen, A.; Mäenpää, P.H. (1994^b)**. Insemination results with slow cooled stallion semen stored for 70 or 80 hours. *Therio* 42: 1043-1051.
128. **Heitland, A.V.; Jasko, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W.(1995)**. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biol. of Reprod. Mono* 1: 753-759.

129. **Heitland, A.V.; Jasko, D.J.; Squires, E.L.; Graham, J.K.; Pickett, B.W.; Hamilton, C. (1996).** Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Eq. Vet. J.* 28 (1): 47-53.
130. **Henry, M; Figueiredo, AEF; Palhares, MS; Coryn, M. (1987^a).** Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle in donkeys (*Equus asinus*). *Journal-of-Reproduction-and-Fertility.* 35, Supplement, 297-303.
131. **Henry, M; Palhares, MS; Figueiredo, AEF. (1987^b).** Reproduction in asses: sexual behaviour and seasonal ovarian activity. *Informe-Agropecuario.* 13: 148, 27-30.
132. **Henry, M.; Gastal, E.L.; Meira, C. (1987^c).** Características do sêmen de jumentos da raça Nordestina. *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, p72.*
133. **Henry, M.; McDonnell-SM; Lodi-LD; Gastal-EL; Wade, J. (ed.); Allen, WR (ed.); Rossdale, P.D. (ed.) (1991).** Pasture mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. *Equine Reproduction V. Journal-of-Reproduction-and-Fertility.* Supplement 44, 77-86.
134. **Henry, M.; Lodi L. D; Gastal, M. M. F. O (1998).** Sexual behaviour of domesticated donkeys (*Equus asinus*) breeding under controlled or free range management systems. *Applied Animal Behaviour Science.* Volume 60, Issues 2-3, 263-276.
135. **Henry, M; Silva, K.M.; Souza, M.C.N.; Resille, D.N.; Melo, M.I.V.; Becker, A.R.C.L. (1999).** Seminal parameters of donkeys: influence of the season. *Rev. Bras. Reprod. Anim,* 23:3, 237-238.
136. **Henry, M. (2001).** Some reproductive characteristics of donkeys. *Pratique-Veterinaire-Equine.* 33: 129, 11-20.
137. **Henry, M.; Snoek, PPN.; Cottorello, ACP. (2002).** Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology;* Volume 58, Issues 2-4 Pages 245-248.
138. **Hidalgo, M; Rodriguez, I, Dorado, J; Pérez, C; Corral, S; Sanz, J. (2003)** Valoración objetiva de la morfología de la cabeza del espermatozoide del caballo de Pura Raza Española. *IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Araucas (Las Palmas)* 89.

139. **Hillman-RB; Olar-TT; Squires-EL; Pickett-BW. (1980).** Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioural characteristics of stallions. *Journal-of-the-American-Veterinary-Medical-Association*, 177: 8, 720-722.
140. **Holt, WV; Pickard, AR. (1999).** Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Rpeod.*; 4: 143-150.
141. **Hughes, JP; Loy, RG. (1970).** Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. *Cornell Vet.*;60(3):463-75.
142. **Hurtgen, J.P.; Johnson, L.A. (1982).** Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. *J. Reprod. and Fert. Suppl.* 32: 15-20.
143. **Hutchins, B. (1986).** The difference between asses and horses. *The Brayer (Winter)*, Denton, Texas.
144. **Ionata, L.M.; Anderson, T.M.; Pickett, B.W.; Heird, J.C.; Squires, E.L. (1991).** Effect of supplementary sexual preparation on semen characteristics of stallions. *Therio* 36 (6): 923-938
145. **Jasko, D.J.; Lein, D.H.; Foote, R.H. (1990^a).** Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *JAVMA* 197 (3): 389-394.
146. **Jasko, D.J.; Lein, D.H.; Foote, R.H. (1990^b).** A comparison of two computer automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J. Androl.* 11:453
147. **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. *Therio* 35 (6): 1059-1067.
148. **Jasko, D.J.; Hathaway, J.A.; Schaltebrand, V.L.; Simper, W.D.; Squires, E.L. (1992^a).** Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Therio* 37: 1241-1252.
149. **Jasko-DJ (1992^b).** Evaluation of stallion semen. *Veterinary-Clinics-of-North-America,-Equine-Practice*, 8: 1, 129-148.
150. **Jasko, D.J.; Moran, D.M.; Farlin, M.E.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1992^c).** Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. *Am. Assoc. Eq. Pract.* 649-660.

151. **Jasko, DJ; Little, TV; Lein, DH; Foote, RH (1992^d)**. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *Journal-of-the-American-Veterinary-Medical-Association*, 200: 7, 979-985.
152. **Jeyendran, RS; Van der Ven, HH; Zaneveld, LJ. (1992)**. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl.*;29(2):105-16. Review.
153. **Johnson, L; Thompson, DL. Jr. (1983)**. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology-of-Reproduction*, 29: 3, 777-789.
154. **Kadir-E; Fdail-L; Souab-H. (1983)**. Contribution to mule production in Morocco by means of artificial insemination: review of the literature. *Maghreb-Veterinaire*, 1: 1, 39-41 (med-line).
155. **Kayser, J.P.; Amann, R.P.; Shideler, R.K.; Squires, E.L.; Jasko, D.J.; Pickett, B.W. (1992)**. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Therio* 38: 601-614.
156. **Kavak, A; Johannisson, A; Malmgren, L; Rodriguez-Martinez, H; Aidnik, M; Einarsson, S. (2001)**. Post-thaw evaluation of stallion spermatozoa using triple fluorescent staining and flowcytometry. *Animal Reproduction Science*, Volume 68, Issues 3-4, Pages 349-350.
157. **Keller, A.; Malschitzky, E.; Hött, A.; Vieira, M.J.; Mattos, R.; Gregory, R.M.; Mattos, R.C. (2001)**. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. *Animal Reproduction Science* Volume 68, Issues 3-4, Pages 135-365
158. **Kenney, R.M.; Cooper, WL. (1974)**. Therapeutic use of phantom for semen collection. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* , 165, 706-707.
159. **Kenney, R.M.; Bergman, RV; Cooper, WL.; Morse, GW. (1975)**. Minimal techniques for breedings mares: technique and preliminary finding. *Procd. 21 st Ann. Conv. A.A.E.P.*, 5:21, 327-335
160. **Kenney, R.M.; Hurtgen, J.; Pierson, R.; Witherspoon, D.; Simons, J. (1983)**. Clinical fertility evaluation of the stallion. *Society for Theriogenology Manual*.
161. **Kenney, R.M.; Kent, M.G.; García, M.C.; Hurtgen, J.P. (1991)**. The use of Dna index and karyotype analyses as adjuncts to the estimation of fertility in stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44: 69-75.

162. **Kenney, R.M; Evenson, D.P.; García, M.C.; Love, C.C. (1995).** Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rates. *Biol. of Reprod. Mono.* 1: 647-654.
163. **Kirk, E.S.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (2001).** Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *Animal Reproduction Science; Volume 68, Issues 3-4, Pages 135-365.*
164. **Klug, E.; Treu, H.; Hillmann, H.; Heize, H. (1975).** Results of insemination of mares with fresh and frozen stallion semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 107-110.
165. **Kosiniak, K. (1975).** Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 59-61.
166. **Kreuchauf, A. (1983).** Reproductive behaviour in the ass (*Equus asinus*). Tesis doctoral. Ludwig-Maximilians-Universitat Munchen; German Federal Republic. 127 pp.
167. **Langlais, J.; Roberts, K.D. (1985).** A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam. Res.* 12: 183-224.
168. **Launay, F. (1990).** Etude de la conservation de la semence de baudet du poitou. Tesis doctoral ENVN. (citada por Trimeche 1996)
169. **Leipold, SD; Graham, JK; Squires, EL; McCue, PM; Brinsko, SP; Vanderwall, DK. (1998).** Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*;49(8):1537-43.
170. **Liu DY, Baker HW. (1988).** The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertil Steril.*; 50(2):288-93.
171. **Lodi, L.D.; Henry, M.; Paranhos da Costa, M.J.R. (1995).** Behaviour of donkey jacks (*equus asinus*) breeding horse mares (*equus caballus*) at pasture. *Biol. Repro. Mono.* 1, 591-598.
172. **Loomis, PR; Amann, RP; Squires, EL; Pickett, BW. (1983).** Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *Journal-of-Animal-Science*, 56: 3, 687-693.

173. **Loomis, PR; Squires, EL. (2001).** The equine frozen semen industry. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 191-200.
174. **Love, C.C.; García, M.C.; Riera, F.R.; Kenney, R.M. (1991).** Evaluation of measurements taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44: 99-105.
175. **Love, C.C. (1997).** Examination of the male reproductive tract: Evaluation of potential breeding soundness. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Ed. Youngquist, R.S. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
176. **Love, CC; Kenney, RM. (1998).** The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*; 50(6):955-72.
177. **Love, CC; Thompson, JA; Brinsko, SP; Rigby, SL; Blanchard, TL; Varner, DD; Evans, MJ (2002).** Equine reproduction VIII. Proceedings of the Eighth International Symposium on Equine Reproduction, Fort Collins, USA, July 2002. *Theriogenology*, 58: 2-4, 221-224.
178. **Macpherson, M; Simmen, R; Simmen, F; Hernandez, J; Sheerin, B; Varner, D; Cadario, M; Miller, C; Loomis, P; Brinsko, S; Rigby, S; Blanchard, T. (2001).** Insulin-like growth factor I and associated binding proteins in equine seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, Volume 68, Issues 3-4, Pages 347-348.
179. **Magistrini, M; Chanteloupe, PH; Palmer, E. (1987).** Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fertil.*; 35 (Suppl); 127-133.
180. **Magistrini, M.; Palmer, E. (1991).** Motility, triple stain and electron microscopic analysis of spermatozoa treated with ionophore A23187 for in vitro fertilization. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44: 661-663.
181. **Magistrini M, Couty I, Palmer E. (1992^a).** Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta Vet Scand Suppl.*; 88:97-110.
182. **Magistrini, M.; Vidament, M. (1992^b).** L'insémination artificielle chez les équidés. *Rec. Méd. Vét. Spécial Reproduction des Equidés*: 959-966.
183. **Magistrini, M.; Seguin, F.; Beau, P.; Akoka, S.; Le Pape, A.; Palmer, E. (1995).** H nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital fluids and seminal plasma. contribution of the accessory sex glands to the ejaculate. *Biol. Reprod. Mono* 1: 599-607.

184. **Magistrini, M; Vidament, M; Clement, F; Palmer, E (1996)**. Fertility prediction in stallions. *Animal-Reproduction-Science*, 42: 1-4, 181-188
185. **Magistrini, M.; Sattler, M.; Yvon, J.-M.; Vidament, M. (1997)**. Freezability of Stallion Spermatozoa Evaluated by -Motility, Membrane Integrity, and ATP Content. Abstracts of Papers Presented at the Thirty-Fourth Annual Meeting of the Society for Cryobiology, *Cryobiology*; 35(4):88.
186. **Magistrini, M.; Samper, J.C. (ed.) (2000)**. Semen evaluation. En: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. W.B. Saunders company. Ed. J. Samper. Pennsylvania.
187. **Malmgren, L; Kamp, B-op-den; Wockener, A; Boyle, M; Colenbrander, B; Op-Den-Kamp, BO. (1994)**. Motility, velocity, and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. *Reproduction-in-Domestic-Animals*, 29: 7, 469-476
188. **Malmgren, L. (1997)**. Assessing the quality of raw semen: A review. *Therio* 48: 523-530.
189. **Mann, T; Minotakis, C.S.; Polge, C. (1963)**. Semen composition and metabolism in the stallion and Jackass. *J. Reprod. Fert.* 5, 109-122.
190. **Mann, T. (1975)**. Biochemistry of stallion semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 23: 47-52.
191. **Martin, J.C.; Klug, E.; Günzel, A.R. (1979)**. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27: 47-51.
192. **Martín Rillo, S. (1996)**. Avances en el control de la reproducción en ganado porcino. En: *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal*. Ed. de la Universidad de Castilla- La Mancha, Cuenca
193. **Mazur, P. (1963)**. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.*; 47:347-69.
194. **McDonnell, SM. (1992)**. Normal and abnormal sexual behavior [horses]. *Veterinary-Clinics-of-North-America,-Equine-Practice.* 8:1, 71-89.
195. **McKenzie, F. F.; Lasley, J. F.; Phillips, R. W. (1939)**. The storage of horse and swine semen. *Am. Soc. Anim. Prod.* pp 222–225.

196. **Medeiros, ASL; Gomes, GM; Carmo, MT; Papa, FO; Alvarenga, MA; Evans, MJ. (2002).** Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58: 2-4, 273-276
197. **Meira, C; Ferreira, JCP; Papa, FO; Tornero, MTT; Bicudo, SD. (1995).** Study of the estrous cycle in donkeys (*equus asinus*) using ultrasonographic and plasma progesterone concentrations. *Biol. Reprod. Mono.* 1: 403-410 – Equine Reproduction VI.
198. **Meira, C; Ferreira, J.C.P; Papa, F.O; Henry, M. (1998^a).** Ultrasonographic evaluation of the conceptus from 10 days to 60 of pregnancy in jennies. *Theriogenology* 49: 8, 1475-1482.
199. **Meira, C; Ferreira, J.C.P; Papa, F.O; Henry, M. (1998^b).** Ovarian activity and plasma concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies. *Theriogenology* 49: 8, 1465-1473.
200. **Mello, SL.; Henry, M.; Souza, MC.; Oliveira, SM. (2000).** Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5° C. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootech.*; 52(4): 372- 378
201. **Merkt, H.; Klug, E.; Krause, D.; Bader, H. (1975).** Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 105-106.
202. **Millette, CF. (1999).** Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA; Vol 4: 586-596
203. **Miró, J.; Lobo, V.; Medrano, A.; Rigau, T. (2003^a).** Dinámica folicular en la burra Catalana. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Araucas (Las Palmas) 82.
204. **Miró, J.; Lodrá, M.; Gonzalez, R.; Lobo, V.; Rigau, T. (2003^b).** Comportamiento sexual del Garañón Catalán en época reproductiva. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal.. Araucas (Las Palmas) 84.
205. **Miró, J.; Medrano, A.; Lobo, V.; Peña, A.; Rigau, T. (2003^c).** Conservación de semen refrigerado de Garañón Catalán. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal.. Araucas (Las Palmas) 86.
206. **Miró, J.; Medrano, A.; Lobo, V.; Peña, A.; Rigau, T. (2003^d).** Primeros resultados para la congelación de semen en el Garañón Catalán. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Araucas (Las Palmas) 87.

207. **Morais, R.N.; Mucciolo, R.G.; Viana, W.G. (1993)**. Reproductive biology of donkeys. 1. Testis measurements and sexual behaviour during semen collection. *Bra. J. Vet. Res. Anim.* 30:1, 47-50.
208. **Morais, R.N.; Mucciolo, R.G.; Viana, W.G. (1994^a)**. Reproductive biology of donkeys. 3. pH, osmolality and electrolytes concentration of the semen. *Bra. J. Vet. Res. Anim.* 31: 2, 145-151.
209. **Morais, R.N.; Mucciolo, R.G.; Viana, W.G. (1994^b)**. Reproductive biology of donkeys. 2. Physical and morphological semen traits. *Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 31:2, 145-151
210. **Moran, DM; Jasko, DJ; Squires, EL; Amann, RP (1992)**. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 38: 6, 999-1012.
211. **Müller, Z. (1987)**. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35: 121-125.
212. **Neild, D; Chaves, G; Flores, M; Mora, N; Beconi, M; Agüero, A. (1999)**. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51: 4, 721-727.
213. **Neild, DM; Gadella, BM; Chaves, MG; Miragaya, MH; Colenbrander, B; Agüero, A. (2003)**. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59: 8, 1693-1705.
214. **Nishikawa, Y. (1959)**. Studies on reproduction in horses. Japan Racing Ass, Tokyo.
215. **Nishikawa, Y. (1975)**. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. *J Reprod Fertil Suppl.*; (23):99-104.
216. **Oettle, E (1986)**. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet. Med.* 81 (3): 263-266.
217. **Oliveira, JV.; Resende, FD.; Carmo, MT. (2002)**. Study of the reproductive function of donkeys (*Equus asinus*) in the period of low brightness in Colina, Sao Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Reproducao Animal.* 26:2, 97-98.
218. **Ostrowski, JEB.; Cortesano, JA. (1987)**. Production of mules by means of artificial insemination. 1. Management of asses for semen collection. *Revista de Medicina Veterinaria*, 68: 4, 210-216.

219. **Pace, M.M.; Sullivan, J.J. (1975).** Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 115-121.
220. **Palmer, E. (1984).** Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 3, abstr. 377.
221. **Palmer E, Magistrini M (1992).** Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet Scand Suppl.*;88:137-52.
222. **Pantke, P.; Hyland, J.H.; Galloway, D.B.; Liu, D.Y.; Baker, H.W.G. (1995).** Development of a zona pellucida sperm binding assay for the assessment of stallion fertility. *Biol. Reprod. Mono* 1: 681-687.
223. **Papa, FO; Bicudo, SD; Moreira, AF (1989).** Método de coloração espermática na avaliação do sêmen descongelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Suppl.* n. 1, 228.
224. **Parks, J.E.; Graham, J.K. (1992).** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* 38: 209-222.
225. **Parlevliet, JM; Colenbrander, B (1999).** Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. *Equine-Veterinary-Journal*, 31: 3, 248-251.
226. **Parrish, JJ; Foote, RH. (1986).** Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod.*; 35(2): 253-7.
227. **Pattie, W.A.; Dowsett, K.F. (1982).** The repeatability of seminal characteristics of stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32: 9-13.
228. **Peña, CE; Dean, EC; Ayala-Fierro, F. (2003).** Toxicología ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Proyecto de Investigación Básica para el Superfund otorgado a la Universidad de Arizona (Grant P42 ESO 4940). (INTERNET).
229. **Pickett, B.W.; Komarek, R.J. (1966).** Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 50 (5): 753-757.

230. **Pickett, BW; Back, DG. (1973)**. Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen. Colorado State University. Fort Collins; USA.
231. **Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Byers, M.S.; Pace, M.M.; Remmenga, E.E. (1975^a)**. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fert. Steril.* 26:167-174.
232. **Pickett, B.W.; Sullivan, J.J.; Seidel, G.E. (1975^b)**. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J. Anim. Sci.* 40: 917-923.
233. **Pickett, B.W.; Faulkner, LC; Seidel, GE-Jr; Berndtson, WE; Voss, JL (1976)**. Reproductive physiology of the stallion. VI: Seminal and behavioural characteristics. *J. Anim. Sci.* 43: 617-625.
234. **Pickett, BW; Squires, EL; Voss, JL. (1982)**. Techniques for training a stallion to a phantom for seminal collection. *Journal-of-Equine-Veterinary-Science*, 2: 2, 66-67.
235. **Pickett, B.W.; Voss, J.L.; Squires, E.L. (1983)**. Factors affecting quality and quantity of stallion spermatozoa. *The Comp. Cont. Educ.* 5 (5): 259-267.
236. **Pickett BW; Amann, RP. (1987)**. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Equine Vet. Sci.* 7(5): 289-302.
237. **Pickett, B.W. y McKinnon, AO. (ed.); Voss, JL. (ed) (1993^a)**. Sexual behaviour. Factors affecting sperm production and output. Collection and evaluation of semen for artificial insemination. Reproductive evaluation of the stallion. En: *Equine reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
238. **Pickett, B.W.; Amann RP.; McKinnon (ed.); Voss, JL (ed.) (1993^b)**. Cryopreservation of semen. En: *Equine reproduction*. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
239. **Pickett, B.W. (1995)**. The Stallion: Retrospective Analyses and Opinions. *Equine Reproduction VI. Biol. Reprod. Monograf.* 1, 547-564.
240. **Pommer, A.C.; Rutllant, J., Meyers, S.A. (2003)**. Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions 1. *Biology of Reproduction* 68, 1208–1214
241. **Province, CA; Squires, EL; Pickett, BW; Amann, RP. (1985)**. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology.*, 23: 6, 925-934.

242. **Quinn PJ. (1981)**. The fluidity of cell membranes and its regulation. Review. *Prog Biophys Mol Biol.*;38(1):1-104.
243. **Rao Veeramachaneni, D.N.; Sawyer, H.R. (1996)**. Use of semen as biopsy material for assessment of health status of the stallion reproductive tract. *Vet. Clinics of N.A.: Equine Practice*, 12 (1): 101-110.
244. **Rigby, SL; Brinsko, SP; Cochran, M; Blanchard, TL; Love, CC; Varner, DD; Squires, EL. (2001)**. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 171-180.
245. **Robl, JM. y Fissore, RA. (1999)**. Gametes, Overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E. Knobil and JD. Neill. Academic Press, San Diego, USA; vol 2: 430-434.
246. **Rodero, E.; Valera, M.; Herrera, M.; Gómez, M.; Galisteo, J. (1998)**. Situación actual de la población asnal autóctona española. *Arch. Zootec.* 47: 523-528.
247. **Rousset, H.; Chanteloube, P. Magistrini, M. (1987)**. Assessment of fertility and semen evaluations of stallions, *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 25-31.
248. **Samper, J.C.; Hellander, J.C.; Crabo, B.G. (1991)**. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44: 107-114.
249. **Samper, J.C. (1995)**. Stallion semen cryopreservation: male factors affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Theriogenology*, 160-165.
250. **Samper, J.C. (1997)**. Current techniques for artificial insemination. En: *Current therapy in Large Animal Theriogenology*. Ed. Youngquist, R.S. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
251. **Samper JC, Morris CA. (1998)**. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49(5):895-903.
252. **Samper, JC. (2000)**. *Equine Breeding management and artificial insemination*. W.B. Saunders company. Ed. J. Samper. Pennsylvania.

253. **Samper, JC; Squires, EL. (2001).** Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal-Reproduction-Science*, 68: 3-4, 219-228.
254. **Samper, JC; Vidament, M; Katila, T; Newcombe, J; Estrada, A; Sargeant, J; Evans, MJ. (2002).** Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-centre study. *Theriogenology*, 58: 2-4, 647-650.
255. **Santos, G.F.; Henry, M.; Sampaio, I.M; Gastal, E.L. (1995).** Effect of cooling system and rate of cooling sperm quality of donkey semen preserved at 5°C. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 761-767.
256. **Sanz, J.; Rodríguez, I.; Acosta, M.; Pérez, C.; Mota, J. (1999).** Situación actual de la congelación de esperma equino. *II Congreso Ibérico De Reproducción Animal.* 175-176.
257. **Shier WT. (1988).** Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. *Cryobiology*; 25(2):110-20.
258. **Silva, SS; Henry, M; Nunes, SA; Mello, SLV. (1997).** Effect of packaging on the quality of frozen donkey semen, evaluated in vitro after thawing. *Revista-Brasileira-de-Reproducao-Animal*, 21: 3, 140-146.
259. **Silva, R; Barbosa, M; Agrícola, R; Mateus, L (2003).** Effect of season on testicular size and function of lusitano stallions. *IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal.. Araucas (Las Palmas)* 88.
260. **Singer, S. J.; Nicholson, G.L. (1972).** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.
261. **Squires, EL; Pickett, BW; Amann, RP. (1979).** Effect of sucesive ejaculation on Stallion seminal Characteristics. *J Reprod Fertil*; 27; 7-12.
262. **Squires, E.L.; Todter, G.E.; Berndtson, W.E.; Pickett, B.W. (1982).** Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallions. *J. Anim. Sci.* 54 (3): 576-582.
263. **Squires, E.L.; Badzinski, S.L.; Amann, R.P.; McCue, P.M.; Nett, T.M. (1997).** Effects of altrenogest on total scrotal width, seminal characteristics, concentrations of LH and testosterone and sexual behaviour of stallions. *Therio* 48: 313-328.

264. **Stöhr, M.; Vogt-Schaden, M. (1981).** A new dual staining technique for simultaneous flow cytometric DNA analysis of living and dead cells. *Acta Pat. Microb. Scand. Sec. A, Suppl 274*: 96-98.
265. **Sullivan, J.J.; Pickett, B.W. (1975).** Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl. 23*: 29-34.
266. **Svendsen, DE. (1997).** The Professional handbook of the donkey. 3ª Edición Whittet Books. The Donkey Sanctuary, Sidmouth, Devon.
267. **Talbot, P.; Chacon, R.S. (1981).** A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool. 215*: 201-208.
268. **Taylor, TS.; Matthews, NS.; Blanchard, TL. (2002).** An overview of reproduction in Donkeys. *New England Journal of Large Animal Health. 2*:1,35-37.
269. **Tejada, RI; Mitchell, JC; Norman, A; Marik, JJ; Friedman, S. (1984).** A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.*;42(1):87-91.
270. **Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE (1998).** Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod.*;58(3):786-93.
271. **Thompson, D.L.; Pickett, B.W.; Squires, E.L.; Amann, R.P. (1979).** Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl. 27*: 13-17.
272. **Thompson, DL Jr; Evans, JW.(ed.) (1992).** Reproductive Physiology of stallion and jack. *Horse Breeding and managemen. World Animal Science. Volumen C7*, 232-261.
273. **Tischner, M.; Kosiniak, K.; Bielanski, W. (1974).** Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *J. Reprod. Fert.*, 41:329-335,
274. **Tischner, M. (1975).** Results of artificial insemination of horses in Poland in the post-war period. *Journal-of-Reproduction-and-Fertility, Suppl. 23*, 111-114.
275. **Tischner-M (1979).** Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal-of-Reproduction-and-Fertility. 1979, Suppl. 27*, 53-59.

276. **Todd , P.; Arns , M.J.; Chenoweth , P.; Schultz, B. (2001)**. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 60:3-4, 335-336.
277. **Töpfer-Petersen, E.; Calvete, JJ.; Dostálová, ZZ.; Reinert, M.; Waberski, D.; Sanz, L. y Hübner, T. (1995)**. One year in the life of the spermadhesin family. *Fertilität*; 11: 233-241
278. **Trimeche, A; Tainturier, D. (1995)**. Etude échographique de la cinétique folliculaire des baudettes du poitou pendant l'oestrus au cours du printemps et de l'été. *Revue méd. Vét.* 146, 11, 743-748.
279. **Trimeche, A. (1996 a)**. Estudios sur la fertilite et la cryopreservation du sperme du baudet du Poitou. Tesis doctoral Universidad de Rennes. Francia.
280. **Trimeche, A.; Renard, P.; Lannou, D. Le.; Barrière, P.; Tainturier, D. (1996b)**. Improvement of motility of post-thaw Poitou Jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* 45:1015-1027.
281. **Trimeche, A.; Renard, P.; Tainturier, D. (1997a)** Concentration séminale et effet cryoprotecteur du fructose chez le sperme du baudet du Poitou. *Rev. Méd. Vet.* 148:8-9, 717-720.
282. **Trimeche, A; Tainturier, D. (1997b)**. Comparision of two poitou jackasses sperm freezing methods and optimization of glycerol concentration. *Rev. Méd. Vét.* 148:5, 439-444.
283. **Trimeche, A.; Renard, P.; Tainturier, D. (1997c)**. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou jackass sper. *Criobiology* 34:4, 385-393.
284. **Trimeche, A.; Renard, P.; Tainturier, D. (1998)**. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology* 50:793-806.
285. **Troedsson, M.H.T.; Liu, I.K.M.; Crabo, B.G. (1998)**. Sperm transport and survival in the mare. *Therio* 49: 905-915.
286. **Turner, R.M.; Sertich, P.L. (2001)**. Use of alkaline phosphatase activity as a diagnostic tool in stallionswith azoospermia and oligospermia *Animal Reproduction Science*, Volume 68, Issues 3-4, Pages 347-348.
287. **Vandeplassche, GM; Wesson, JA; Ginther, OJ. (1981)**. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. *Theriogenology*.16: 2, 239-249.

288. **Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Love, C.L.; Garcia, M.C.; Kenney, R.M. (1987^a)**. Effects of seminal fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 28: 709-723.
289. **Varner, J.D.; Ward, C.R.; Storey, B.T.; Kenney, R.M. (1987^b)**. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 48 (9): 1383-1389.
290. **Varner, DD; Blanchard, TL; Love, CL; Garcia, MC; Kenney, RM. (1988)**. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 29: 5, 1043-1054.
291. **Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Meyers, P.J.; Meyers, S.A. (1989)**. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 24°C. *Therio* 32: 515-525
292. **Verstegen, J; Iguer-Ouada, M; Onclin, K; Wheeler, MB (ed.); Smith, L (2002)**. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 1, 149-179.
293. **Vidament, M; Dupere, AM; Julienne, P; Evain, A; Noue, P; Palmer, E. (1997)**. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48: 6, 907-917.
294. **Vidament, M; Cognard, E; Yvon, JM; Sattler, M; Palmer, E; Magistrini, M. (1998)**. Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reproduction-in-Domestic-Animals*, 33: 3-4, 271-277.
295. **Vidament, M; Magistrini, M; Palmer, E.; Clément, F. (2000)**. Equine artificial insemination in French National Studs. *Reproduction-In-Domestic-Animals*. 2000; Suppl. 6 : 61-66.
296. **Vidament, M; Yvon, JM; Couty, I; Arnaud, G; Nguekam-Feugang, J; Noue, P; Cottron, S; Le Tellier, A; Noel, F; Palmer, E; Magistrini, M. (2001)**. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci.*; 68(3-4): 201-18.
297. **Vidament, M; Daire, C.; Yvon, JM.; Doliguez, P.; Bruneau, B.; Magistrini, M; Ecot, P: (2002)**. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide, *Theriogenology*; Volume 58, Issues 2-4 Pages 249-25.
298. **Volkman, D.H.; Van Zyl, D. (1987)**. Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 143-148.

299. **Voss, J.L. (1993)**. Breeding efficiency. En: Equine reproduction. Ed. McKinnon, A.O. y Voss, J.L. Lea & Febiger, Pennsylvania.
300. **Watson, P.F. (1990)**. Artificial insemination and the preservation of semen. En Marshall's physiology of reproduction. Vol. 2: Male reproduction. Ed. G.E. Lamming, Londres.
301. **Wilhelm, K.M.; Graham, J.K.; Squires, E.L. (1996)**. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation and zona-free hamster oocyte penetration. *Therio* 46: 559-578.
302. **Yates, DJ; Whitacre, MD. (1988)**. Equine artificial insemination. *Veterinary-Clinics-of-North-America,-Equine-Practice*, W.B. Saunders Company, Ed. Intermedica, Philadelphia, 4: 2, 291-306.
303. **Zhang, J.J.; Boyle, M.S.; Smith, C.A.; Moore, H.D.M. (1990)**. Acrosome reaction of stallion spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona-free hamster eggs. *Mol. Reprod. and Dev.* 27: 152-158.