

IMPORTANCIA DE LOS DILUYENTES PARA LA CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN EN SEMEN EQUINO



Karen Tatiana Abril Galvis

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria**

**Bogotá
2023**

IMPORTANCIA DE LOS DILUYENTES PARA SEMEN EQUINO

Karen Tatiana Abril Galvis

Trabajo de grado presentado para optar al título de Médico Veterinario

**Director
Dr. Sebastian Bonilla
MV; MSc; PhD**

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria**

**Bogotá
2023**

Tabla de contenido

1. Resumen
2. Planteamiento del problema
3. Justificación
4. Objetivos
 - 4.1 Objetivos generales
 - 4.2 Objetivos específicos
5. Metodología
 - 5.1 Materiales
 - 5.2 Búsqueda y revisión
 - 5.2.1 Definición de los criterios de inclusión y exclusión de bibliografía
 - 5.2.1.1 Tipo de estudios
 - 5.2.1.2 Tipos de medidas de resultados
 - 5.2.1.3 Localización de los estudios
 - 5.2.2 Evaluación de la calidad de los estudios
 - 5.2.3 Extracción de datos
 - 5.2.4 Criterios de exclusión
6. Marco Teórico
 - 6.1 Fisiología espermática
 - 6.1.1 Desarrollo del espermatozoide
 - 6.1.2 Espermatogénesis
 - 6.2 Calidad Espermática
 - 6.2.1 Características macroscópicas
 - 6.2.2 Examen microscópico
 - 6.3 Colección de Semen y su procesamiento
 - 6.4 Diluyentes en semen equino
 - 6.4.1 Funciones de los diluyentes Composición de los diluyentes
 - 6.4.2 Composición de los diluyentes
 - 6.4.3 Diluyentes a emplear en la práctica
 - 6.4.4 Comparación de los diluyentes más utilizados en el mercado
7. Discusión
8. Conclusiones
9. Bibliografías

1. Resumen

La refrigeración de semen equino es una técnica de reproducción asistida que ha ido aumentando su uso y desarrollo en los últimos años, ya que permite el almacenamiento y transporte de semen manteniendo su fertilidad potencial por alrededor de 24 horas. Los diluyentes se han constituido como alternativa para compensar los problemas que ocurren durante la preservación y conservación del semen equino, pues se les puede adicionar diversas moléculas con propiedades antioxidantes. Se han desarrollado distintos diluyentes de refrigeración de semen para lograr que el espermatozoide mantenga sus cualidades para un eyaculado fecundante, existiendo en la actualidad una gran cantidad de diluyentes comerciales basados en distintos elementos y así lograr la preservación adecuada de los espermatozoides. La optimización de estos busca garantizar la máxima viabilidad y fertilidad posible del semen (Ribeiro et al., 2015).

El objetivo de esta recopilación bibliográfica es resaltar la importancia que tienen los diluyentes para la conservación y preservación de semen equino, las principales funciones que un diluyente debe cumplir con el fin de tener resultados exitosos en su utilización y evaluar que tipo de diluyente fue el mejor para utilizar en la práctica.

Palabras claves: refrigeración, semen, conservación, viabilidad, fertilidad, diluyentes

Abstract

Equine semen refrigeration is an assisted reproduction technique that has been increasingly used and developed in recent years, as it allows semen to be stored and transported while maintaining its potential fertility for around 24 hours. Extenders have been established as an alternative to compensate for the problems that occur during the conservation or preservation of equine semen, since various molecules with antioxidant properties can be added to them. Different semen refrigeration extenders have been developed to ensure that the sperm maintains its qualities for a fertilizing ejaculate, there are currently a large number of commercial extenders based on different elements and thus achieve adequate sperm preservation. The optimization of these seeks to guarantee the maximum possible viability and fertility of the semen (Ribeiro et al., 2015).

The aim of this bibliographic compilation was to highlight the importance of extenders for the conservation and preservation of equine semen, the main functions that an extender must fulfill in order to have successful results in its use and to evaluate what type of extender is the best. . to use in practice.

Keywords: refrigeration, semen, conservation, viability, fertility, extenders.

2. Planteamiento del problema

Con el aumento del comercio internacional y la creciente demanda por mejorar las capacidades deportivas de los equinos, se ha desarrollado un mayor interés por implementar métodos que permitan la manutención del semen con capacidad fecundante por períodos más prolongados de tiempo. Junto a esto la evolución de la inseminación artificial (IA) como técnica para implementar el uso de diferentes tipos de este, como fresco, refrigerado y congelado, y la cual ayuda a prevenir riesgos, transmisión de enfermedades y costos del transporte. (Sandoval, 2010)

Coincidentemente con este uso ampliado ha habido variaciones considerables en la tasa de éxito. Parte de esta variabilidad puede atribuirse a un efecto de fertilidad propio de la hembra, del macho o a la capacidad del semen de ciertos potros de sobrevivir el enfriamiento, almacenamiento y transporte. Es por esta razón que se han probado distintos elementos en variadas concentraciones para su uso como diluyentes de semen, con el fin de lograr una mayor sobrevivencia de los espermatozoides, ya sean para inseminación con semen fresco (Aurich, 2006).

Por esto la industria de la equitación ha estado trabajando arduamente en las últimas décadas para mejorar las capacidades equinas de los especímenes, pero lograr esto no ha sido fácil ya que los criadores han visto que requieren mejorar y estar al borde de las novedades en términos genéticos, pero los mejores especímenes no siempre se consiguen en la misma área geográfica de modo que se inicia una necesidad de hacer uso del ejercicio del comercio internacional para adquirir en este caso semen de lugares muy lejanos.

Si se evalúa, es una inversión muy importante por ello la creciente demanda estimulada por las diversas locaciones por esto la manutención del semen toma un papel importante y la presión por la preservación del material biológico aumenta exponencialmente, esto porque hay una conservación prolongada de los espermatozoides lo que puede hacer que pierda su motilidad y con ello la capacidad de atravesar la membrana que recubre el óvulo para lograr la tan anhelada fecundación.

Otro tema que hay que abordar es que cada semental tiene sus propias características y en ocasiones irónicamente los mejores sementales producen bajísimas cantidades de semen por lo cual la preservación y el manejo es de suma importancia y esto hace que cada día se busquen mecanismos que faciliten el manejo de los elementos biológicos de una manera práctica ya que no todas las muestras tienen las mismas

características, para obtener como resultado crías viables que se puedan entregar al mercado con costos aceptables.

3. Justificación

La inseminación artificial es un método reproductivo, que consiste en la selección de una muestra seminal previamente preparada y optimizada, para depositarla en el útero de la yegua sin la intervención del semental, con el objetivo de aumentar el potencial de los espermatozoides y las posibilidades de fecundación del óvulo, ofrece una serie de ventajas como: mejoras en la fertilidad, disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas, facilita los programas de selección y mejoramiento genético, se evita la monta del macho en la yegua, se tiene mayor control sobre los procesos hormonales y fisiológicos de la gestación (Rodríguez, 2010)

El diluyente es una herramienta fundamental que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar la calidad espermática, manteniendo la fertilidad adecuada.

La preservación exitosa del esperma se ve afectada por una combinación de temperatura de almacenamiento, velocidad de enfriamiento, composición de plasma seminal (SP), control higiénico y la composición química del extensor. Las alteraciones que ocurren en la membrana plasmática del esperma durante la eyaculación pueden causar un efecto diferente de varios extensores que en los espermatozoides eyaculados (Loomis, 2006).

Teniendo en cuenta la información presentada, es importante realizar una recopilación de información que guíe a los lectores a entender cuales son las herramientas necesarias para el desarrollo de adecuadas prácticas de conservación y preservación que brindan los diluyentes para la obtención de semen equino con mayor viabilidad.

4. Objetivos

4.1 Objetivos generales:

Resaltar la importancia que tienen los diluyentes para la conservación y preservación de semen equino

4.2 Objetivos específicos:

Conocer los diferentes tipos de diluyentes que se pueden emplear en la práctica para la conservación de semen equino

Establecer cuales son las características principales de un diluyente en óptimas condiciones

Realizar una revisión bibliográfica que permita ampliar el concepto de Diluyentes de semen equino

5. Metodología

En el presente trabajo se recopiló una serie de datos por medio de la metodología de revisión sistemática, seleccionando información actual y haciendo uso de investigaciones realizadas en años anteriores, que permitieron resaltar la importancia e identificar las características de los diferentes tipos de diluyentes de semen equino que se emplean en la práctica.

Este fue un estudio cualitativo bajo la modalidad transversal descriptiva en el cual se usaron fuentes bibliográficas en español, artículos científicos, revistas, libros y tesis.

5.1. Materiales

- Bases de datos científicas como Scielo,
- Buscadores específicos en internet como Google académico, etc
- Libros de reproducción equina, medicina equina
- Artículos de revistas científicas y revisión de divulgación
- Literatura gris

5.2. Búsqueda y revisión.

Se realizó una búsqueda y revisión de literatura sobre el concepto de diluyente para semen equino, funciones, características, componentes, se investigó toda la información a la que se tuvo acceso a través de buscadores online específicos, bases de datos, tesis, estudios científicos, investigaciones de universidades. Teniendo en cuenta las palabras clave que guiaban la búsqueda, estas son: Diluyentes de semen equino, refrigeración de semen equino, conservación de semen equino, características de semen equino.

5.2.1 Definición de los criterios de inclusión y exclusión

5.2.1.1 Tipo de estudios

Los estudios que se incluyeron para enriquecer la data del trabajo incluyen: estudios descriptivos, correlacionales, explicativos, longitudinales, experimentales, estos con el eje central de reproducción equina, conservación, preservación y refrigeración de semen equino.

5.2.1.2 Tipos de medidas de resultados

Reportes y estudios comparativos de diluyentes más utilizados para semen equino adquiridos en trabajos de investigación (trabajos de grados, artículos, revistas, libros, etc.)

5.2.1.3 Localización de los estudios

Revisión de trabajos de grado de diferentes universidades, estudios científicos, búsqueda electrónica de artículos en revistas, consulta de profesionales expertos en el tema y empleo de términos de búsqueda específicos.

5.2.2 Evaluación de la calidad de los estudios

Se evaluaron la calidad de los estudios con la intervención de varios observadores (tutor y estudiante)

5.2.3 Extracción de datos

Se aplicaron criterios de inclusión a todos los artículos, reportes potencialmente informativos. Los siguientes datos fueron tenidos en cuenta en cada estudio: año de publicación, el autor, lugar , año, el idioma.

5.2.4 Criterios de exclusión bibliográfica

Se tuvieron en cuenta algunos criterios para la exclusión de bibliografía tales como:

- El idioma, siendo excluidos trabajos que no fuesen en español o inglés.
- Año de publicación, revisando que fuesen mínimo del año 2005 en adelante.
- Legibilidad lingüística de los documentos.

6. Marco teórico

6.1 Fisiología espermática

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula haploide que tiene por función transportar el genoma masculino y fusionarse con el gameto femenino (ovocito) fenómeno que dará lugar posteriormente al embrión (Samper, 2005).

6.1.1 Desarrollo del espermatozoide:

Se originan en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. (Samper, 2005). Estos túbulos seminíferos se encuentran tapizados por un gran número de células epiteliales germinales llamadas espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número. Se espera que un porcentaje de estas células sufren modificaciones para su transformación en gametos masculinos. Cabe destacar, estas células haploides ya diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad (Varner y Johnson, 2007)

6.1.2 Espermatogénesis

Es el proceso de proliferación, maduración y diferenciación que tiene lugar en los túbulos seminíferos mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides.

Consta de tres etapas primordiales que cambian su morfología conocidas como espermatogénesis, divisiones meióticas y espermiogénesis (Samper, 2005). La fase final de la espermatogénesis se conoce como espermiación, que es la liberación de espermátidas hacia el lumen de los túbulos seminíferos (Varner & Johnson, 2007). Los espermatozoides que abandonan el testículo continúan su maduración y tránsito a través del epidídimo. Este consta de tres segmentos, conocidos como cabeza, cuerpo y cola (England, 2005a).

En el macho de la especie equina las glándulas sexuales accesorias corresponden a las glándulas bulbouretrales, próstata, vesículas seminales y ampollas (England, 2005a). Sus secreciones, junto con fluido secretado por los testículos y epidídimo, forman el plasma seminal, que conforman la mayor parte del volumen del eyaculado. El plasma seminal se involucra en una serie de funciones espermáticas y eventos que preceden la fertilización (Kareskoski ; Katila, 2008)

El epidídimo es el órgano encargado de proporcionar el ambiente idóneo para la maduración final de los espermatozoides y de su almacenaje, adquiriendo de este modo la motilidad y su capacidad para fecundar, se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola.

Durante el tránsito por este órgano el espermatozoide cumple una serie de transformaciones morfológicas y funcionales que le aportan características como la motilidad y la capacidad de reconocer la zona pelúcida una vez madurados los espermatozoides se acumulan en la cola del epidídimo hasta la eyaculación (Cornwalt, 2009).

Es necesario que se presenten tres procesos fisiológicos para que obtengan la capacidad fertilizante, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración del espermatozoide se adquiere durante su tránsito por el epidídimo. Una vez que los espermatozoides son transportados en el epidídimo y transitan a través de la cabeza, cuerpo hasta llegar a la cola del epidídimo, se consideran igualmente maduros que los eyaculados y son potencialmente fértiles. La capacitación y reacción acrosomal ocurren después de que el espermatozoide ha sido eyaculado dentro del aparato reproductor de la hembra y es transportado hacia el oviducto. Sin embargo, a diferencia de los espermatozoides de eyaculado, los espermatozoides de epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal que pudieran modificar las características estructurales de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994). Estas diferencias confiere cierta ventaja, en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la capacitación, a los espermatozoides de cola de epidídimo sobre los espermatozoides de eyaculado. Dicha ventaja prosigue durante la reacción acrosomal (García-Macedo y col., 2001).

6.2 Calidad Espermática

En forma natural el proceso de fecundación se realiza en un sistema cerrado, en que el pene penetra en la vagina, sin que su semen tenga contacto con el medio ambiente. Al incluir técnicas de reproducción asistida, este sistema cerrado se abre, siendo el semen extraído mediante el uso de una vagina artificial para su evaluación en el laboratorio, sometido a refrigeración o congelación para ser luego introducido instrumentalmente en la hembra. Esta manipulación implica la exposición del eyaculado a factores exógenos que podrían llevar a una disminución en la calidad espermática (Loomis, 2006).

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Aurich, 2006).

La calidad espermática puede medirse mediante la evaluación macroscópica del eyaculado, microscópica de una pequeña muestra de semen, microbiológica, morfológica de los espermatozoides y pruebas de fertilidad potencial más específicas (Varner, 2008).

6.2.1 Características macroscópicas

1. Volumen Seminal: Esta característica del eyaculado del potro está influenciada por diversos factores tales como edad, clima, reposo sexual y temperamento del animal (Perez Sampallo, 1980), para hacer la estimación del número total de espermatozoides por eyaculado. Volumen seminal libre de la fracción gel por concentración espermática ($\times 10^6$ /ml) (Yates y Whitacre, 1988).
2. pH: El pH del semen del potro varía en un rango entre 7.0 y 7.5, o sea es levemente alcalino. Normalmente el pH debería ser ligeramente mayor en el segundo eyaculado (Dowsett, 1988; Díaz y Díaz, 1989).
3. Color: El color del semen de potro normal, varía entre blanco acuoso a blanco cremoso dependiendo de la concentración espermática.
4. Olor: El olor es característico para el semen de cada especie y, por tanto, muy difícil de describir; solamente la práctica permite distinguir un olor anormal. El examen por medio de olfacción podría servir para distinguir algunas infecciones (Díaz y Díaz, 1989).

6.2.2. Examen microscópico

1. Motilidad Progresiva: Se evalúa el porcentaje de espermatozoides que presentan movimientos de traslado caudo cefálico. La falta absoluta de motilidad progresiva se clasifica como 0% de motilidad. La lectura de este parámetro se realiza tomando una gota de semen puro entre porta y cubreobjetos previamente calentados a 37–39°C en platina térmica y observando en microscopio de luz con aumentos de 250-400 X. Si bien dicha evaluación es de carácter subjetivo, se ha observado frecuentemente que, dentro de las características seminales, esta sería la que mejor estima la fertilidad real de un eyaculado (Jordán, 1988).

2. Concentración Espermática: Esta característica seminal es considerada como la demayor variabilidad natural en el potro (Jordán, 1988) y estaría influenciada por la estación del año, el estado nutricional, la edad del animal, el tamaño de testículos (Gebauer y Pickett, 1974) y la raza (Heyne, 1979). Los valores considerados como normales oscilan entre 25 y 800 millones de espermatozoides por mil (Faulkner y Pineda, 1981). Para la evaluación de esta característica se describen los siguientes Métodos: espectrofotómetro, contador automático de células espermáticas y hemocitómetro (Dowsett, 1988; Yates y Whitacre, 1988). El método del hemocitómetro (cámara cuenta glóbulos rojos de NEBAUER). Consiste en una dilución de 1:100 del semen con suero fisiológico y tinción con rosa de bengala al 8%,

el resultado se expresa en número de espermatozoides/ml. por 10⁶ (Díaz y Arancibia, 1971).

3. Vitalidad espermática: la técnica consiste en mezclar una gota de semen, dos gotas de nigrocina y una gota de eosina sobre un portaobjeto, homogenizar bien y hacer un frotis sobre un portaobjeto a 37°C. El resultado se expresa en porcentaje de espermatozoides no teñidos (vivos). Los espermatozoides muertos se tiñen rojos; (Díaz y Arancibia 1971). El nivel máximo de espermatozoides muertos aceptados en el eyaculado de potro medido por este método, no debe superar el 40 % y porcentajes inferiores al 20 % deberían ser calificados como muy buenos (Díaz y Díaz 1989).

4. Morfología Espermática: Se deben evaluar un mínimo de 100 espermatozoides en busca de anomalías morfológicas, dentro de las que se incluyen deformaciones de la cabeza, cabezas dobles, cabeza doblada, gotas citoplasmáticas distales, colas dobles o enrolladas, entre otras (Blanchard et al., 2003b). En el potro se reporta como normal y aceptable un rango que no exceda de 30 % de anomalías espermáticas totales y de 10 de anomalías primarias (Bielansky, 1975; Dowsett 1988).

Los espermatozoides de esta especie son extremadamente sensibles a las alteraciones celulares generadas por la congelación. El mejoramiento de los procedimientos de criopreservación de semen equino pueden derivarse en un uso más eficiente de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones y la fecundación in vitro.

Diferentes técnicas y crioprotectores han sido evaluados. Sin embargo, han persistido alteraciones marcadas sobre la movilidad, la viabilidad y la morfología de los espermatozoides equinos, las cuales a la vez se han atribuido al estrés térmico, al estrés osmótico y principalmente al estrés oxidativo involucrado en los procesos de criopreservación. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es la especie reactiva de oxígeno (ERO) más comprendida en el daño de los espermatozoides equinos, siendo generada por la acción de la superóxido dismutasa (SOD) sobre el anión superóxido, el cual es el principal radical libre producido por el espermatozoide equino (Ball, 2008).

Cuando las ERO (especies reactivas de oxígeno) son generadas en exceso, se presenta una consecuente disminución de la fertilidad, principalmente como resultado de la peroxidación de los lípidos de membrana, lo cual es promovido por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de los espermatozoides equinos.

Adicionalmente, se ha planteado que los procesos de congelación de semen, conducen a la pérdida de la actividad de defensa antioxidante, por el daño estructural del citoesqueleto y de las enzimas antioxidantes (Kankofer, Neild 2008).

Para contrarrestar, anular o minimizar los efectos de las ERO sobre los espermatozoides, se ha suplementado el semen equino con una variedad de sistemas antioxidantes, entre los cuales se encuentran SOD, catalasa (CAT), glutatión

reducido, ácido ascórbico y α -tocopherol. La remoción del plasma seminal durante el procesamiento del semen para su criopreservación, también favorece el estrés oxidativo del semen equino, toda vez que la mayoría de su capacidad antioxidante se encuentra allí (Baumber J, 2005).

El plasma seminal equino posee actividades considerables de SOD y de glutatión-peroxidasa (GPx), y otras moléculas presentes en el plasma seminal, como vitamina C, vitamina E, urato, albumina, taurina, hipotaurina, piruvato y lactato, podrían actuar como antioxidantes.

6.3 Colección de semen y su procesamiento

El desarrollo de la inseminación artificial ha aportado grandes ventajas a la reproducción animal, permitiendo el máximo aprovechamiento del potencial genético de sementales de alta calidad, mejorando el control sanitario, evitando posibles daños durante la monta o el transporte de animales e incluso mejorando los resultados de fertilidad en casos de yeguas subfértiles (Hernandez, M., et al, 2011)

La inseminación artificial se puede realizar mediante semen fresco, refrigerado o congelado.

Para lograr obtener una muestra de semen del macho existen múltiples métodos, cuya utilización depende del uso que se le vaya a dar al semen obtenido (inseminación de yeguas, evaluación de la capacidad reproductiva de un potro, evaluación microbiológica).

Dentro de los métodos de obtención de semen existe el uso de vagina artificial, eyaculación química, muestra del goteo post – monta, uso de condones en el macho y muestras de espermatozoides obtenidos desde el epidídimo (Sheerin, 2007). El método más frecuentemente utilizado para obtener semen destinado a inseminar yeguas es el uso de vagina artificial. Ésta puede utilizarse cuando el macho monta a una yegua en celo, o al montar un maniquí, o aplicarla directamente en el pene sin que el potro monte. La obtención del semen en la vagina artificial y su manipulación en el laboratorio puede dañar los espermatozoides por variaciones en su temperatura, iluminación y exposición a contaminantes, entre otros. El uso de lubricantes solubles en agua para preparar la vagina artificial representa una posible fuente de contaminación del semen. La mayoría de estos lubricantes son muy hiperosmóticos, por lo que si ellos toman contacto con el semen durante la colección, son una fuente de generación de estrés osmótico sobre el espermatozoide con su subsecuente disminución en motilidad (Ball, 2008).

Sin embargo, estos cambios no son iguales en todos los sementales, de modo que existe una gran variabilidad individual en cuanto a la tolerancia del semen a la

manipulación y la refrigeración; esto se traduce en que un tercio de los sementales no soportan el proceso de refrigeración (Allen, 2005).

En el caso de la congelación, se considera que sólo el 30% de sementales tienen buena capacidad de congelación, independientemente de su fertilidad en monta natural (Brinsko et al., 2000; Loomis y Graham, 2008). Partiendo de un número limitado de ejemplares que superan el 50% de motilidad progresiva, lo que empeora los resultados obtenidos tras el procesamiento del semen. Debido a todo lo señalado anteriormente, en la clínica actual se tiende a mejorar la calidad del semen mediante varias técnicas y a conseguir que ésta se mantenga durante el almacenamiento, ya sea en refrigeración o en congelación (Johannisson et al., 2009).

Algunas de las técnicas empleadas con este fin son: la separación del plasma seminal (Brinsko et al., 2000), los colchones de centrifugación (Ecot et al., 2005; Waite et al., 2008) y las técnicas de selección de espermatozoides, las cuales tienen como resultado la obtención de un menor número de espermatozoides que la muestra inicial pero con mejores características, por ejemplo, la migración espermática (con la que se obtienen espermatozoides con mayor motilidad), la filtración (se mejora la integridad de la membrana) y la centrifugación coloidal (cuyo resultado es una mayor motilidad, mayor proporción de espermatozoides morfológicamente normales, con buena estabilidad de membrana e integridad de la cromatina) (Morrell et al., 2009a; Morrell et al., 2009b), y menor proporción de espermatozoides con cambios apoptóticos (los cuales están relacionados con infertilidad en otras especies) (Brum et al., 2008).

Una vez recolectado y examinado el semen, se procede a su conservación. Si se reduce de 2°C hasta 4°C la temperatura del esperma, evitando que entre en contacto con el oxígeno, los espermatozoides pueden conservar su capacidad fecundante hasta 24-48 horas tras la recogida del eyaculado. La temperatura óptima de conservación es entre 5-15°C. No obstante, el semen también puede conservarse a temperaturas de congelación nitrógeno líquido (-170°C) siendo la viabilidad infinita mientras no se pierda la cadena de frío.

Para la conservación del semen, es necesario emplear diluyentes con base acuosa cuya osmolaridad se modifica agregando glucosa, leche condensada con 60% de agua, yema de huevo, gelatina, fosfato, lactosa, glicerol o antibiótico. En cuanto al gradiente de dilución; un tercio para la conservación y un décimo cuando vaya a ser usado de forma inmediata. Si el semen va a ser congelado para su posterior uso, es necesario el uso de glicerol, para proteger el esperma de la formación de cristales y el uso de antibióticos, para controlar el crecimiento bacteriano.

6.4 Diluyentes de Semen Equino

En la especie equina, existe una rápida disminución de la capacidad fertilizante de sus espermatozoides tras su almacenamiento al ser comparado con otras especies tales como los porcinos y caprinos (Aurich, 2006). Además, se describen grandes diferencias en la fertilidad potencial del semen tras su almacenamiento entre distintos machos e incluso entre distintos eyaculados provenientes de un mismo potro (Padilla y Foote, 1991; Pommer et al., 2002; Aurich, 2006; Akcay, 2008).

Un diluyente de semen es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias para su utilización en inseminación artificial, y al mismo tiempo preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Barrera, 2006; Rueda, 2011; Córdova et al., 2015).

Se espera que un diluyente sea capaz de preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides además de su motilidad; también debe tamponar la acidificación del medio consecuencia del metabolismo de los espermatozoides, proveerlos de nutrientes o sustratos metabolizables que aumentan su longevidad ya que les aportan energía, especialmente si están en condiciones ambientales desfavorables en las cuales no sobreviviría en su forma pura.

Las cualidades de un buen diluyente son que provea de un ambiente favorable al espermatozoide, de fácil preparación y almacenamiento, de bajo costo y que nos permita una evaluación del semen de forma precisa.

La decisión sobre cuál diluyente utilizar depende de las características seminales individuales de cada padrillo dependientes de las diferencias en constituyentes específicos del diluyente.

6.4.1 Funciones del diluyente

Para llevar a cabo su misión el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano mediante la adición de antibióticos. Cuando el semen se usa para inseminar poco después de recolectarse, debe mezclarse con el diluyente en una proporción de 1:1 a 1:3 (semen a diluyente). Se recomienda que la dilución sea más extensa si el semen habrá de almacenarse durante mucho tiempo antes de la inseminación de 1:3 a 1:5 (Hafez y Hafez, 2000)

6.4.2 Composición de los diluyentes

En consecuencia, un diluyente apropiado de semen, según los antecedentes del estado de la técnica, debe contener 4 principales componentes:

- Un sustrato metabólico
- Agente protector
- Agente para el control de pH y la osmolaridad
- 1 o más antibióticos

Se ha estudiado la suplementación de los diluyentes con sustancias proteicas que actúan como protectores extracelulares, tales como la yema de huevo, la albúmina sérica bovina, el suero equino, el suero bovino, la proteína de soya, el alcohol polivinílico y la leche descremada ultra- pasteurizada (Palacios & Quintero, 1996; Boeta & Quintero, 2000).

El aprovechamiento de los efectos benéficos combinados de diferentes sustancias útiles para la protección de las células espermáticas ha enfocado muchos esfuerzos en la búsqueda de nuevas formulaciones de diluyentes que mejoren la conservación del semen equino, incluyendo otros ingredientes químicos para ajustar el pH y la osmolaridad, así como la utilización de antibióticos con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano y de diversas sustancias antioxidantes (Salazar et al., 2011; Ball, Medina, Gravance & Baumber, 2001; Baumber & Ball, 2005).

Algunos diluyentes contienen antibióticos como polimixina B, amikacina, amikacina y penicilina y ticarcilina; siendo los más usados el sulfato de amikacina (1mg/mL) y la penicilina potásica (1000 UI/mL). El uso de la gentamicina, por su mayor daño a los espermatozoides en comparación con los anteriores ha ido disminuyendo.

El tipo de antibiótico puede afectar la motilidad espermática, como se ha demostrado mediante estudios en los cuales la gentamicina sobre cierta concentración disminuye la motilidad. Sin embargo, en un estudio reciente los diluyentes usando gentamicina resultaron mejores en la retención de la motilidad espermática que otros diluyentes. Evidentemente, el nivel de gentamicina usado en estos diluyentes no fue detrimental en la motilidad espermática (LeFrappier y col, 2010)

Leche descremada: Los diluyentes a base de leche descremada en polvo son usados comúnmente para la dilución de semen para la Inseminación Artificial, tanto con semen fresco como refrigerado, por mantener bien la motilidad espermática y la fertilidad. La leche descremada UHT o la leche descremada en polvo reconstituida (10 g de leche en polvo con 0,1% de grasa en c.s.p 100ml de agua destilada; reportados por Meirelles y col en 1999), pueden ser utilizados como diluyentes para la preservación de semen equino refrigerado. Mattos en el 2000 sugiere que sean evaluadas diversas marcas, tanto de leche descremada en polvo como UHT, porque existen variaciones en los resultados obtenidos entre marcas.

Aportan caseína, fosfocaseinato y beta lactoglobulinas que generan una función protectora frente al estrés por frío (Sandoval, 2010).

Yema de Huevo Las lipoproteínas y fosfolípidos que contiene la yema de huevo son componentes que presentan una función protectora frente al daño ocasionado por la congelación, generalmente usado huevo de gallina, aunque se han reportado buenos resultados con huevo de otras especies como patos (Castro y Chacon, 2016). Existen diluyentes comerciales que contienen fosfolípidos provenientes de la lecitina de soya, mientras que otros no contienen este componente, por tal motivo se adiciona la yema de huevos frescos, generalmente limpiando previamente los huevos y utilizando separadores de yema, retirando los excesos de clara con papel filtro (Pineda y Pinilla, 2007)

Glicerol: Es una sustancia protectora, a pesar que no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, generando un efecto negativo en la motilidad y fertilidad post-descongelación. Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, provocando a su vez desnaturalización de proteínas. El principal efecto tóxico puede estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Arriaga, Ampuero, Huanca y Terreros, 2015).

Dimetil Sulfóxido: Es un agente protector que gracias a su bajo peso molecular (78.13 g/mol) le permite atravesar la membrana celular de forma rápida, evitando que se produzcan cristales intracelulares en el proceso de criopreservación celular (Lopez, 2021).

Albúmina sérica bovina : BSA se halla tanto en el suero de la leche como en el plasma sanguíneo de los bovinos. Es la proteína más cuantiosa en el sistema circulatorio 50 gL^{-1} , contribuye en un 80% al mantenimiento de la presión osmótica sanguínea y es la gran responsable de mantener el pH sanguíneo.

Proteína de Soya: La soya contiene lecitina, una fracción de fosfolípidos que podría sustituir a las lipoproteínas de alto peso molecular y los fosfolípidos de la yema de huevo y prevenir el daño de la membrana plasmática del espermatozoide que se produce durante el enfriamiento y la conservación. Los diluyentes a base de lecitina de soya se han evaluado para procesar y congelar el semen, como una alternativa aceptable.

6.4.3 Diluyentes a emplear en la práctica

Para la refrigeración y conservación de semen equino actualmente se utilizan ampliamente en el mercado los diluyentes que se relacionan a continuación. Si bien en la siguiente relación se mencionan los componentes principales de estos diluyentes, es probable que algunos de ellos importantes no aparezcan divulgados, pues constituyen información propietaria de los fabricantes.

1. Botucrio®
 - Agua no pirogenica
 - Yema de huevo de gallina 5%
 - Glicerol 1%
 - Metilformamida 4%
 - Taurina y Glicina
 - Trealosa y bajas cantidades de glucosa
 - Penicilina cristalina y amikacina

2. INRA96®
 - Caseina de Leche
 - Yema de Huvo (2-4%)
 - Glicerol (2.5%)

3. Gent®
 - Yema de huevo
 - Glicerol
 - Antibioticos

4. EZ- freezing LE®
 - Yema de Huevo
 - Lactosa
 - Glucosa
 - Equex STM
 - Citrato de sodio dihidrato
 - EDTA disodico
 - bicarbonato de sodio
 - Glicerol
 - Ticarcilina

5. Equipro®
 - Suero de leche
 - Gentamicina
 - Glicina

6.4.4. Comparación de los diluyentes más utilizados en el mercado

Alternativas son el Gent®, un diluyente compuesto de soluciones tampón, leche, yema de huevo y glicerol; y el Equipro®, constituido por caseinatos, proteínas de suero, glucosa, sacarosa y sulfato de gentamicina (Janett et al., 2012)

En 2014 se compararon para preservación seminal de caballo criollo colombiano, se tuvieron en cuenta los eyaculados con una motilidad progresiva mínima del 70% y concentración de 100 millones de espermatozoides por mL, se procesaron las muestras mediante un protocolo de conservación rápida y se evaluaron los parámetros de: motilidad total, motilidad progresiva, velocidad rectilínea, velocidad curvilínea, velocidad media, mediante un microscopio de contraste, la morfología y vitalidad espermática se establecieron mediante tinción de eosina-nigrosina fijados en una lámina, la integridad de la membrana también se evaluó mediante el uso de una combinación hipo-osmótica, para evaluar el hinchamiento celular. Los resultados obtenidos fueron: una mayor tasa de motilidad total para el diluyente Equipro®, siendo que los demás aspectos evaluados mostraron semejanza, y otros con grandes diferencias 24 como los indicadores de velocidad y desplazamiento que se atribuyen a efectos inherentes a la composición de los diluyentes (Celis et al., 2014).

Comparación de cinco diluyentes comerciales

En 2019 se comparó la viabilidad obtenida a partir de la refrigeración de semen equino con el uso de cinco mezclas de diluyentes comerciales: INRA96 + INRA Freeze, BotuSemen + BotuCRIO, EquiPlus + Gent Freeze, EquiPlus + EquiPlus Freeze y Gent + Gent Freeze, se evaluó la motilidad total y progresiva post congelación siendo que los mejores resultados se presentaron con INRA96 + INRA Freeze y BotuSemen + BotuCRIO siendo atribuido la menor concentración de glicerol presente en estos, y los menos óptimos se presentaron con Gent + Gent Freeze, adicionalmente se determinó que los diluyentes que contengan proteínas de leche como: INRA96 + INRA Freeze, EquiPlus + EquiPlus Freeze son preferibles para una dilución inicial respecto a diluyentes que contengan yema de huevo (Bollweinb, Handler, Neuhauser y Siudab, 2019).

7. Discusión

El aprovechamiento de los efectos benéficos combinados de diferentes sustancias útiles para la protección de las células espermáticas ha enfocado muchos esfuerzos en la búsqueda de nuevas formulaciones de diluyentes que mejoren la conservación del semen equino, incluyendo ingredientes químicos para ajustar el pH y la osmolaridad, así como la utilización de antibióticos con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano y de diversas sustancias antioxidantes (Salazar et al., 2011; Ball, Medina, Gravance & Baumber, 2001; Baumber & Ball, 2005).

Los diluyentes mencionados incluyen como parte de su composición sustratos energéticos, utilizados fundamentalmente para preservar la motilidad de las células espermáticas, parámetro tradicionalmente usado como indicador de la viabilidad de los espermatozoides y también como predictor de la fertilidad.

Se puede afirmar que el uso de diluyentes de semen químicamente definidos reduce la variabilidad potencial entre lotes, asociada a los diluyentes basados en leche desnatada o yema de huevo. El diluyente Equi-Pro contiene caseinatas y proteínas seleccionadas del suero de la leche en lugar de leche desnatada, y una cantidad de diferentes azúcares y glicina. Un diluyente de proteínas definidas de la leche, provoca una calidad seminal similar o mejor a los diluyentes basados en yema de huevo.

El uso de leche descremada como diluyente de refrigeración de semen equino otorga una buena protección espermática por 24 o 48 horas, dependiendo de la leche que sea utilizada.

Resultados obtenidos podrían verse mejorados si se añadieran elementos adicionales a la leche descremada, como antibióticos. Ya que el semen es obtenido mediante vagina artificial, este está expuesto a contaminarse con la flora bacteriana normal presente en la superficie del pene del macho, que podría generar una disminución en su viabilidad tras su almacenamiento refrigerado.

Los efectos protectores de estos diluyentes están presentes también durante la centrifugación, como también se obtienen mejores resultados con medios de refrigeración comerciales, que con diluyentes realizados en el propio laboratorio a partir de los diferentes ingredientes (yema de huevo, glicerol, etc). La decisión de optar por uno u otro de estos diluyentes dependerá del tiempo estimado entre la recogida del semen y la inseminación.

Sin embargo, existe una gran variedad de problemas asociados al uso de semen refrigerado, el más importante es que no todos los reproductores donantes pueden usarse para producir y enviar semen refrigerado, pues su fertilidad decrece cuando el semen es procesado, enfriado y transportado en dispositivos de refrigeración.

8. Conclusiones

- Los componentes del diluyente a utilizar para la conservación del semen equino posterior a su obtención, son de gran importancia; de ello depende el éxito obtenido en su utilización, ya sea para fines de inseminación artificial, para investigación o cualquier otro fin.
- Diluyentes con sustancias proteicas que actúan como protectores celulares como la yema de huevo, albúmina sérica bovina, proteína de soya, leche descremada ultra- pasteurizada provocan una mejor calidad seminal
- Debido al proceso de centrifugación el diluyente debe asegurar una mayor recuperación de células espermáticas mediante la protección de su membrana, proveer energía necesaria para que los espermatozoides, una vez descongelados, recuperen la viabilidad y vitalidad para fecundar. Además, deben tener capacidad amortiguadora para evitar cambios de pH y neutralizar los ácidos resultantes del metabolismo del esperma, así como controlar contaminantes microbianos.
- La decisión de optar por uno u otro de estos diluyentes dependerá del tiempo estimado entre la colección del semen y la inseminación.

9. Bibliografía

Alvarenga y Papa. 2011. Actualización sobre criopreservación de semen equino. Experiencias y resultados. Congreso argentino de reproducción equina, Mendoza, Argentina. Pp 493-98

Bollweinb, H., Handler, J., Neuhauser, S., y Siubad, M. (2019). Comparación de los efectos de cinco diluyentes de semen en la calidad del esperma epididimario equino congelado-descongelado. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080619300887>

Benito, L., & San, Á. Accesit fidel pages mirave 2011 Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado . Iscii.es. Recuperado de: <https://scielo.iscii.es/pdf/sm/v67n3/articulo2.pdf>

Carlos, J. y Montealegre, S. (sin fecha). Estabilidad de albúmina sérica bovina en solución acuosa en presencia de ventas de tetraalquilamonio . Edu.Co. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/83964/80098322.2023.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Carnevale If, E. y Cuntinho Da Silva, M. 2005. Técnicas de reproducción asistida. In: Reed, S.; Bayly, W. y Sellon, D. Medicina interna equina, vol. a ed. Argentina, Intermédica. pp. 1250 – 1256.

Canisso IF, Carvalho GR, Torres CAA,Guimarães JD, Souza FA, Silva EC, & amp; Martins LF. 2008. Sexual behavior of jacks when an estrous mare is used in semen collection. Animal Reproduction Science, 107, 314.

Castro, J., y Chacón, J. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática. Conexión Agropecuaria JDC, 6(1), 45–64. Recuperado de: <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/54>

Córdova, A., Ruiz, C., Córdova, C.A., Córdova, M.S., Guerra, J., Rodríguez, B., Arancibia, K. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 3 (1): 01-38

Ferrante. (Dakota del Norte). Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino. Uba.Ar. Recuperado de: <http://www.fvet.uba.ar/archivos/publicaciones/invet/vol22-1-2020/ART-6-VOL-22-2020.pdf> (Dakota del Norte). Googleapis.com. Obtenido de: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c4/bd/0c/a0e41bdd0acb2d/WO2015027354A2.pdf>

Dutra, C., Graglia, F., y Martínez, M. (2013). Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. comparación entre leche descremada uht y un diluyente comercial. Recuperado de: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/2739/1/FV-29865.pdf>

Gardón JC, Matás C, Gadea J. 2001. Efecto del protocolo de preparación de espermatozoides equinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *An Vet (Murcia)* 17: 19- 26

Giraldo N, Correa J, Vásquez N. 2006. Evaluación del efecto de la refrigeración Sobre la Calidad del semen equino *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 1, núm. 2, , pp. 8-16

Gómez- Cuétara, C. 1996. Manejo del Semental. En: *Equino Aspectos De Cría Y Clínica*. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General De Colegios Veterinarios De España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, 61-80

Loomis PR. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America- Equine practice*, 22, 663-676.

Loomis PR & Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2), 119–128.

Macherson, J. 1960. Sterile milk as a semen diluent. *Canadian Vet. J.* 1: 551– 553.

Moore AI, Squires EL & Graham JK. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* ; 63: 2372-2381

Pineda, S., y Pinilla, S. (2007). Comparación de dos diluyentes Lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo en la preservación de semen equino. Recuperado de: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1314&context=medicina_veterinaria

Restrepo Betancur, G., Úsuga Suárez, A., Montoya Páez, JD, Celis, Á. D. y Henao, AA (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista lasallista de investigación*, 11 (2), 63–70. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-4449201400020000

Restrepo G, Úsuga A; Alberto B. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 8, núm. 1, enero- junio, 2013, pp. 69-81

Restrepo G, Zapata A, Rojano B. 2015. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zootecnia Trop* 31: 79-87

Sandoval C. 2010. Efecto sobre motilidad espermática de distintas leches descremadas comerciales utilizadas como diluyente de refrigeración de semen equino [Tesis de pregrado]. Universidad de Chile.

Sieme, H.; Katila, T. y Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61: 769– 784.

Técnicas empleadas para aumentar la calidad seminal en Caballos. (n.d.). Docplayer.Es Retrieved November 11, 2023, from <https://docplayer.es/73015567-Tecnicas-empleadas-para-aumentar-la-calidad-seminal-en-caballos.html>

Uruguay, M. Universidad de la República Facultad de Medicina Veterinaria Diluyentes de Semen equino para uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. Comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial Equipro. Edu.Uy. Recuperado de : <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/2739/1/FV-29865.pdf>

Vlasiu, T., Groza, I., Morar, I. & Cătană, R. 2008. The effect of different freezing procedures on sperm head morphometry in stallions. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 65(2), 146-151.