



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO SOBRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE DISTINTAS
LECHES DESCREMADAS COMERCIALES UTILIZADAS
COMO DILUYENTE DE REFRIGERACIÓN DE SEMEN
EQUINO

CATALINA DE LOS ÁNGELES SANDOVAL LÓPEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: DR. ENRIQUE PINTO PEÑA

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO SOBRE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE DISTINTAS LECHES DESCREMADAS COMERCIALES UTILIZADAS COMO DILUYENTE DE REFRIGERACIÓN DE SEMEN EQUINO

CATALINA DE LOS ÁNGELES SANDOVAL LÓPEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ENRIQUE PINTO PEÑA
PROFESOR CONSEJERO: MARIO ACUÑA BRAVO
PROFESOR CONSEJERO: MÓNICA DE LOS REYES SOLOVERA

SANTIAGO, CHILE
2010

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
Fisiología espermática	2
Calidad espermática	3
Obtención de semen y su procesamiento	7
Plasma seminal	11
Diluyentes de semen	14
Leche descremada	14
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXO	50

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.

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar el uso de distintas marcas de leches descremadas comerciales como diluyente de refrigeración de semen equino, comparándolas entre ellas en su efecto sobre sus características de motilidad espermática.

El estudio fue realizado con cuatro potros pura sangre chileno, obteniéndose cuatro eyaculados por padrillo. Cada eyaculado fue filtrado y evaluado en sus características de concentración espermática, volumen total y libre de gel, motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP); esta evaluación fue considerada a tiempo 0 (T_0). Cada eyaculado fue fraccionado en cuatro partes, siendo cada fracción homogeneizada con una distinta marca de leche descremada (Colun®, Loncoleche®, Soprole® y Surlat®). Cada dilución de semen fue almacenada en refrigeración a 4° C y evaluada en sus características de MT y MP mediante microscopía cada 24 horas hasta las 72 horas de almacenamiento.

Los valores de MT y MP fueron más altos ($p < 0,05$) en la evaluación inicial, disminuyendo progresivamente en el tiempo hasta obtener los menores valores tras 72 horas. Las leches con mejores resultados (Colun® y Soprole®) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas, obteniendo los mejores valores en todos los tiempos evaluados, tanto para MT como para MP. Las leches que obtuvieron los menores valores para MT y MP (Loncoleche® y Surlat®) tampoco presentaron diferencias entre ellas ($p < 0,05$). El potro jugó un rol importante en la mantención de la motilidad, influyendo considerablemente en los resultados. Al diluir semen de los potros con mejor motilidad con las leches que mejor mantenían la motilidad espermática, se permitió la mantención de esta hasta por 48 horas de refrigeración; y las otras marcas hasta por 24 horas. De esta manera la elección de una determinada marca de leche descremada permite la utilización de semen para inseminar hasta por 48 horas al mantenerlo a 4° C.

ABSTRACT

Cooling equine semen is an assisted reproductive technique that has been increasingly used and developed over the last years few years; it allows the storing and transportation of semen, while maintaining its potential fertility up to 24 hours.

The objective of this study was to evaluate different commercial brands of skim – milk in their use as cooling diluents for equine semen; comparing their effect on spermatic motility parameters.

For this study four chilean pure breed stallions where used. Four ejaculates were obtained from each male and each ejaculate was then filtered and measured for its spermatic concentration haracteristics, total and gel - free volume, total motility (MT) and progressive motility (MP). This evaluation was considered to be time 0 (T_0). All the ejaculates were then fractioned into four fractions, and each fraction diluted with a different skim – milk brand (Colun®, Loncoleche®, Soprole® and Surlat®). All the dilutions were stored at 4° C and evaluated for MT and MP every 24 hours for 72 hours.

The MT and MP values were the highest at T_0 , and progressively decreased over the next 72 hours, at which point the lowest values were recorded. The milks with best values (Colun® and Soprole®) did not differ statistically ($p < 0,05$), obtaining the highest values in every evaluated time, for both MT and MP, while the other milks (Loncoleche® and Surlat®) did not differ either, both obtaining the lowest values for MT and MP. The donor stallion was an important factor in the maintenance of sperm motility and influenced the results. When diluting semen of the stallions with the highest motility with the skim – milk brands that better maintain sperm motility, it allowed the maintenance of spermatic motility for up to 48 hours of cooling; and with the other brands up to 24 hours. By choosing the brands that best maintain sperm quality, sperm motility can be preserved for up to 48 hours at 4° C, while the less effective brands maintain the motility for just 24 hours. The election of a particular skim – milk brand allows the use of equine sperm for insemination for up to 48 hours when the semen is maintained at 4° C in a skim – milk extender.

INTRODUCCIÓN

La historia de la inseminación artificial empieza con un relato acerca de algunas tribus árabes que robaban semen de potros de tribus rivales y lo llevaban a casa para “inseminar” sus propias yeguas con una esponja. Esta es una historia que hace mención de que el interés por lograr técnicas de reproducción asistida en la especie equina se viene desarrollando desde hace bastante tiempo.

La primera inseminación artificial (IA) exitosa fue realizada por Spallanzani en 1784 en una perra, que parió tres crías. Desde entonces varios estudios aislados reportaron el uso de IA en conejos, perros y equinos. No fue sino hasta 1907 que la IA tuvo un gran desarrollo gracias a Ivanov, quién la estudió en animales domésticos de granja, zorros, perros, conejos y pollos; y desarrolló diluyentes de semen (Foote, 2002). En esta época, el principal interés por desarrollar esta técnica se basaba en el control de transmisión de enfermedades (Aurich, 2006).

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 mantención del semen con capacidad fecundante por períodos más prolongados de tiempo. Actualmente la mayoría de los registros de razas a nivel mundial, con excepción de la raza fina sangre de carrera, autorizan el uso de la IA y otras técnicas de reproducción asistida para la obtención de crías. Es así como se han ido desarrollando las técnicas de refrigeración y congelación de semen. El proceso de enfriamiento y transporte de semen además provee una manera segura y más barata de reproducir ejemplares, ya que evita los costos y los riesgos asociados al transporte tanto de la hembra como del macho.

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, refrigerado o congelado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Fisiología espermática

La formación del espermatozoide se inicia en el testículo, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Todo este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos y está dividido en tres fases 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 y 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). A medida que los espermatozoides son transportados desde los conductos secretores hacia la cabeza, cuerpo y cola van sufriendo cambios fisiológicos y morfológicos específicos. Estos cambios específicos incluyen la adquisición de capacidad de motilidad progresiva, eliminación de la gota citoplasmática, alteraciones de las membranas plasmática y acrosómica, estabilización del ADN y cambios metabólicos (Marengo, 2008). Además de su efecto en la maduración espermática, el epidídimo cumple con las funciones de concentrar, transportar y almacenar espermatozoides. Tras completar su maduración, estos se mantienen almacenados en la cola del epidídimo (Varner y Johnson, 2007).

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 y Katila, 2008).

Los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de fecundar un ovocito. Ellos deben pasar por cambios de maduración finales dentro del tracto reproductivo de la hembra (Blanchard *et al.*, 2003a). Estos cambios incluyen la capacitación, hiperactivación y reacción del acrosoma (Gordon, 2004). El proceso de capacitación involucra una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide que lo preparan para responder a las señales originadas por el ovocito. De esta manera, la capacitación se define como el proceso a través del cual el espermatozoide se vuelve capaz de fecundar (Blanchard *et al.*, 2003a). Las principales respuestas observadas son la hiperactivación de la motilidad espermática y cambios en la superficie de membrana (Gadella, 2008). Si la capacitación no se completa correctamente, los espermatozoides son incapaces de completar los pasos siguientes para lograr la fertilización (no adquieren movimiento hiperactivo ni son capaces de sufrir reacción del acrosoma) (Varner y Johnson, 2007). La unión del espermatozoide con el ovocito induce cambios en el espermatozoide llamados en su conjunto reacción del acrosoma. Este evento gatilla la fusión y ruptura en múltiples sitios de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, lo que resulta en la liberación del contenido acrosomal (principalmente enzimas) que promueven la interacción, digestión y penetración de la zona pelúcida (Neild *et al.*, 2005). Una vez que se han realizado exitosamente todos estos procesos, el espermatozoide es capaz de fecundar al ovocito (Gadella, 2008).

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).

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).

La evaluación macroscópica incluye la observación a ojo desnudo del eyaculado, lo que permite evaluar volumen, color, densidad, presencia de sangre u otros elementos extraños (England, 2005b).

La evaluación microscópica se realiza depositando una gota de semen sobre un portaobjetos, que se cubre para evaluar mediante microscopía óptica. Dentro de los parámetros más frecuentes a evaluar se encuentran la motilidad total y la motilidad progresiva. La motilidad total corresponde al porcentaje de espermatozoides que exhiben movimiento, independiente del tipo de movimiento y calidad del mismo. La motilidad progresiva es el porcentaje de espermatozoides cuyo patrón de motilidad es mejor (movimiento progresivo), siendo los que teóricamente tienen mayores posibilidades de fecundar (Love, 2007). Al evaluar la motilidad espermática, se evalúa cómo se desempeñará el espermatozoide al ser introducido dentro del tracto reproductivo de la hembra, estimando su capacidad potencial de llegar al sitio de fecundación del ovocito (Varner y Johnson, 2007).

La evaluación morfológica también se realiza mediante microscopía óptica, idealmente con aumento de 1000X. 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). Esta evaluación permite la clasificación de las anomalías morfológicas en primarias, secundarias o terciarias. Las primarias se relacionan con defectos en la espermatogénesis, por lo que son de origen testicular; las secundarias son creadas en el sistema de ductos de excreción y las terciarias son anomalías producto de la manipulación inadecuada (por ejemplo extracción o manipulación de semen inapropiada). De esta manera, este método de evaluación permite

obtener información más específica respecto de una población de espermatozoides y el presunto origen de las anormalidades (Varner y Johnson, 2007).

Las evaluaciones anteriormente mencionadas son las que se llevan a cabo con mayor frecuencia al realizar un examen del potencial reproductivo de un padrillo. Aún cuando los espermatozoides tengan una buena evaluación de acuerdo a los parámetros anteriores, existen situaciones en que se presenta sub fertilidad. Cuando se presentan machos con un examen espermático sin alteraciones, es necesario recurrir a evaluaciones de calidad espermática más específicas (Neild *et al.*, 2005). Dentro de ellas, se incluyen la evaluación de la estructura cromatínica de los espermatozoides, evaluación de la capacidad de los espermatozoides de capacitarse y de sufrir reacción del acrosoma, marcadores bioquímicos de integridad de membrana (Varner, 2008), prueba de estrés hipoosmótico, entre otras (Samper, 2005).

Al realizar el examen reproductivo de un macho, no solo se logra estimar su potencial reproductivo, sino que también se logra obtener datos relevantes para asignar un programa de reproducción para el padrillo. Así, se permite estimar el número de hembras que puede cubrir por temporada, o el número de dosis de semen que se pueden obtener en un día, una semana o un mes sin que se vea afectada negativamente su capacidad reproductiva (Neild *et al.*, 2005).

El espermatozoide en su proceso de maduración pasa por varios cambios de membrana, dentro de los que se incluyen interacción entre lípidos, alteración del grado de saturación de los ácidos grasos (Aurich, 2005), aumento del influjo de calcio intracelular, fusión y vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa, pérdida de colesterol que resulta en una disminución de la proporción colesterol / fosfolípidos en la membrana espermática (Cross, 1998; Pommer *et al.*, 2002). Estos cambios de membrana fisiológicos son parte del proceso de capacitación y se asocian a la adquisición de capacidad fecundante (Aurich, 2005). Si el espermatozoide se capacita o sufre reacción del acrosoma de manera prematura, puede tener disminuida su capacidad para penetrar las células del cúmulo y fecundar el ovocito (Pommer *et al.*, 2002). Espermatozoides que se

capacitan antes de ser introducidos en el tracto reproductivo mediante inseminación artificial tienen menor longevidad que espermatozoides no capacitados. A su vez, si los espermatozoides presentan fallas en completar exitosamente el proceso de capacitación, se considera un indicador de subfertilidad (Neild *et al.*, 2005).

Dado su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los espermatozoides de los mamíferos están predispuestos a sufrir estrés oxidativo. Ellos contactan radicales libres del oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*) durante su paso hacia el ovocito, los secretan como resultado de su actividad mitocondrial (Gadella *et al.*, 2001b), son producidos en mayores cantidades que las normales por los espermatozoides anormales o dañados (Kankofer *et al.*, 2005) y al enfrentarse a condiciones hiper o hipo osmóticas (Burnaugh *et al.*, 2010). El estrés oxidativo está determinado por un desbalance entre la generación y degradación de ROS en un determinado tejido (Baumber *et al.*, 2000). Una leve peroxidación aparenta ser el mecanismo fisiológico para la capacitación de la célula espermática, mientras que una peroxidación excesiva va a dañar la membrana plasmática, resultando en pérdida de motilidad y/o capacidad fecundante (Aurich, 2005). Ball y Vo (2002), detectaron un aumento en la intensidad de la peroxidación lipídica al almacenar espermatozoides a 5° C en un diluyente basado en leche descremada – glucosa, acompañado por una disminución en su motilidad. Esto se contradice con lo planteado por Kankofer *et al.* (2005), quienes sostienen que la peroxidación no sería el mecanismo de daño oxidativo que ocurre sobre la membrana espermática, sino la generación de ROS por otros mecanismos. Los principales ROS que se generan son peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y anión superóxido (O₂⁻) (Ball *et al.*, 2001). Los espermatozoides generan en mayor cantidad O₂⁻, pero el H₂O₂ es mucho más permeable, por lo que este último sería el ROS con mayor importancia en la generación de daño oxidativo en los espermatozoides equinos (Ball, 2008).

El daño oxidativo de membrana provoca un aumento en la permeabilidad, disminuyendo la actividad metabólica de la célula debido la salida de enzimas, sustratos, cofactores de nucleótidos y ATP. La disminución de motilidad no se asocia solamente al daño de membrana espermática, sino también a una disminución en la entrega de energía por parte de la mitocondria causado por la depleción de ATP (Aurich, 2005).

El plasma seminal tiene cierta capacidad de prevenir los efectos negativos de la producción de ROS, dada por la presencia de determinados sistemas enzimáticos y antioxidantes de bajo peso molecular (Kankofer *et al.*, 2005). Los principales sistemas enzimáticos con capacidad antioxidante son el de glutatión peroxidasa / reductasa (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los elementos de bajo peso molecular descritos en el plasma seminal que pueden actuar como antioxidantes son la vitamina E, vitamina C, urato, albúmina, taurina, hipotaurina, piruvato y lactato (Ball, 2008). Estos mecanismos de prevención de daño oxidativo se vuelven insuficientes al almacenar semen, sobretodo en condiciones ambientales adversas (refrigeración o congelación). De esta manera, las causas de generación de estrés oxidativo durante el almacenamiento de semen pueden ser un aumento en la producción de ROS, una disminución en la capacidad antioxidante del semen o una combinación de ambos factores (Baumber *et al.*, 2000; Bustamante Filho *et al.*, 2009).

Al adicionar CAT, que es un captador de H_2O_2 , se disminuye la cantidad de este ROS y se evita la disminución de motilidad producida al incubar espermatozoides en presencia de este compuesto (Baumber *et al.*, 2000). Este efecto no se observa al adicionar GSH ni SOD, que son captadores de O_2^- (Burnaugh *et al.*, 2007). Esto sugiere que la generación de H_2O_2 sería el principal responsable de la pérdida de motilidad en el espermatozoide, pudiendo prevenirse mediante la adición de CAT. Sin embargo, en el estudio de Ball *et al.* (2001), no se detectaron diferencias significativas tras adicionar CAT a un diluyente de leche descremada – glucosa (con y sin plasma seminal) en sus parámetros de motilidad, viabilidad ni integridad acrosomal respecto de los mismos eyaculados sin CAT.

Obtención de semen y su procesamiento

Pese a sus efectos positivos en la longevidad del espermatozoide, el procesamiento del semen altera la integridad de su membrana plasmática, contribuyendo significativamente a una disminución en su motilidad y capacidad de fecundación. Este procesamiento para su almacenamiento, ya sea refrigerado o congelado, incluye la

obtención de semen mediante una vagina artificial, su evaluación, su centrifugación, adición de un diluyente de semen, enfriamiento y almacenamiento por al menos 24 horas (Aurich, 2005).

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).

Si se quieren utilizar protocolos de preservación de semen, una adecuada obtención de semen debiera ser mediante un mínimo de montas y la menor estimulación sexual posible, para disminuir el aporte de las glándulas sexuales anexas. De esta manera, obtenemos un eyaculado de menor volumen, más concentrado y que mantendrá sus características de motilidad por más tiempo al almacenarse refrigerado (Sieme *et al.*, 2004; Loomis, 2006).

El proceso de enfriamiento y congelación de semen genera profundos efectos en el espermatozoide, muchos de los cuales llevan a la generación de daño sub – letal en las

células, con la consecuente reducción en su fertilidad (Ricker *et al.*, 2006). Ya que el espermatozoide maduro ha perdido casi todos sus organelos, los mecanismos de reparación no se encuentran disponibles y los daños producidos en él son irreversibles (Aurich, 2005). Este daño sobre las células espermáticas puede afectar en mayor o menor medida a distintos potros, manifestando grandes diferencias individuales; existen potros que mantienen valores aceptables en cuanto a sus características de fertilidad potencial y otros potros que tras el proceso pierden en gran medida sus características, denominándose malos enfriadores (*bad coolers*) o intolerantes al frío (Tharasanit *et al.*, 2007).

Los efectos de la baja temperatura en el espermatozoide se reflejan principalmente en la estructura y organización de su membrana plasmática. El enfriamiento induce una separación masiva de fases y reordenamiento de los componentes de membrana, eventos que se vuelven irreversibles al volver a calentar al espermatozoide. Estos cambios llevan a que la membrana espermática se vuelva permeable transitoriamente, comprometiendo de esta manera la integridad de membrana (Ricker *et al.*, 2006).

Para disminuir los efectos dañinos sobre la fertilidad potencial asociados al enfriamiento, es necesario enfriar manteniendo curvas de temperatura constantes y velocidades de enfriamiento adecuadas, siendo la velocidad ideal entre 0,03 y 0,05° C por minuto (Avanzi *et al.*, 2006; Nunez *et al.*, 2008). Usualmente el semen es mantenido refrigerado a una temperatura de entre 4 y 6° C, rango que ha demostrado ser el óptimo para mantener tanto la motilidad como la capacidad fecundante (Aurich, 2005).

La superficie del pene y prepucio del macho se encuentra normalmente habitada por flora bacteriana que se considera no patógena. Estas bacterias pueden contaminar el eyaculado obtenido mediante el uso de una vagina artificial, pudiendo por esta vía producir infección en el tracto reproductivo de la hembra o disminuir la fertilidad potencial del semen durante su almacenamiento (Aurich y Spersger, 2007; Price *et al.*, 2008). Se postula que estas bacterias generarían un daño directo sobre las células espermáticas, contribuyendo además al aumento en la generación de ROS en el semen almacenado (Aurich y Spersger, 2007).

La mayoría de los diluyentes de semen incluyen antibióticos, principalmente gentamicina o polimixina B. Price *et al.* (2008) obtuvieron mayor motilidad progresiva, integridad de membrana y velocidad de desplazamiento de los espermatozoides al almacenar eyaculados en un diluyente basado en leche descremada – glucosa en presencia de gentamicina por períodos de 24 y 48 horas, tanto a cinco como a 15° C, al compararlos con el mismo diluyente sin adicionar el antibiótico. Ya que los antibióticos son generalmente efectivos a temperaturas de alrededor de 15° C, en el semen enfriado ejercen su efecto sólo durante el enfriamiento y no durante el tiempo que se mantenga almacenado (Aurich y Spersger, 2007).

Generalmente, el semen utilizado para refrigerar se diluye a una concentración de entre 25 y 50 millones de espermatozoides por ml de solución (Rigby *et al.*, 2001; Brinsko, 2006). Para lograr esta dilución, la proporción mínima de diluyente y semen debiera ser mayor o igual a 2:1. Bozkurt *et al.* (2007) compararon motilidad y viabilidad espermática al almacenar semen a 4° C con distintas concentraciones espermáticas. La concentración con mejores resultados fue de 25 millones de espermatozoides por ml, luego el semen con 50 millones por ml y los menores valores fueron obtenidos al diluir a 75 millones por ml.

Una vez requerido para ser inseminado artificialmente, la dosis necesaria debe contener como mínimo entre 500 millones (Carnevale y Coutinho da Silva, 2005) y un billón de espermatozoides motiles (Loomis, 2006; Vanderwall, 2008), por lo que la concentración espermática debe corregirse por el porcentaje de motilidad progresiva para calcular el número de espermatozoides motiles a inseminar. La dosis requerida puede disminuir al utilizar métodos de reproducción asistida en que los espermatozoides son inseminados más cerca de la unión útero – tubárica (Morris, 2004), como son la inseminación intrauterina profunda, inseminación por histeroscopia, transferencia intratubárica de gametos, entre otros (Carnevale y Coutinho da Silva, 2005).

Plasma Seminal

El plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho (Töpfer – Petersen *et al.*, 2005). Este cumple un rol protector de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra, modulando la respuesta inflamatoria tras la monta (Troedsson *et al.*, 2005), sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares neutrófilos presentes en el útero y juega un rol importante en el transporte de los espermatozoides vivos y la eliminación de los muertos (Loomis, 2006). A su vez, participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática, además de servir como vehículo para los espermatozoides eyaculados. La gran variación que existe entre distintos machos de una misma especie en la calidad espermática del semen refrigerado puede atribuirse, en parte, a diferencias en la composición de su plasma seminal (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). Akcay *et al.* (2006) encontraron variaciones significativas en la motilidad total, motilidad progresiva, velocidad de desplazamiento lineal y curvilínea, e integridad de membrana al intercambiar plasma seminal de distintos potros, respecto de los valores obtenidos al refrigerarlos con su propio plasma seminal. Esto indicaría que este elemento es responsable en gran medida de las variaciones individuales entre machos. Similares resultados obtuvieron Katila *et al.* (2003) en parámetros de motilidad y viabilidad espermática.

Una alta concentración de plasma seminal en el semen equino diluido se considera deletérea para su almacenamiento refrigerado. La centrifugación y remoción de todo el plasma seminal resulta en una reducción significativa en la motilidad de los espermatozoides almacenados en refrigeración cuando se utilizan diluyentes estándar. La centrifugación y remoción parcial del plasma seminal previo a su almacenamiento a 5° C resulta en una mejoría en las características de motilidad. Esto sugiere que es esencial una baja concentración de plasma seminal, o el uso de un sustituto de éste, para mantener las características de motilidad espermática (Rigby *et al.*, 2001; Akcay, 2008). No se describen diferencias en motilidad total ni integridad de membrana espermática al separar

el plasma seminal de las distintas fracciones de un mismo eyaculado, por lo que todas las fracciones de plasma seminal tienen un efecto similar sobre los espermatozoides tras almacenarlos durante 24 horas a 5° C (Kareskoski *et al.*, 2006).

En los últimos 20 años se determinó que el plasma seminal bovino (BSP: *bovine seminal plasma*) contiene una familia de proteínas que son secretadas por las vesículas seminales. Se han descrito homólogos de estas proteínas presentes en el semen de todos los mamíferos, variando sus concentraciones entre las distintas especies. En el toro, estas proteínas del plasma seminal representan el 65% del total de proteínas del semen y en el potro el 1,1% (Bergeron y Manjunath, 2006). En el potro se han caracterizado ocho proteínas de plasma seminal (HSP – 1 a HSP – 8), siendo las más abundantes HSP – 1 y HSP – 2, (renombradas SP1 y SP2) que representan entre un 70 y un 80% del total de proteínas BSP presentes en el plasma seminal (Kareskoski y Katila, 2008). Ha sido demostrado que estas BSP cumplen un rol importante en el establecimiento del reservorio espermático a nivel oviductal, modulan la capacitación (Thérien *et al.*, 1997) y participan en algunos eventos centrales dentro de la fecundación (Töpfer – Petersen *et al.*, 2005).

Estas BSP se unen a los fosfolípidos de colina de la membrana plasmática durante la eyaculación y estimulan el eflujo de colesterol y fosfolípidos desde la membrana espermática (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). En el tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides unidos a BSP interactúan con los componentes del fluido oviductal y/o folicular y estimulan un segundo eflujo de colesterol, lo que resulta en el proceso de capacitación. Se ha determinado que en el tracto reproductivo de la hembra se encuentran heparina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) que inducen el proceso de capacitación. Las BSP interactúan con estos componentes, potenciando de esta manera la capacitación inducida por estas moléculas (Ménard *et al.*, 2003).

A diferencia de su función positiva en la fertilidad, estas BSP pueden ser perjudiciales para el almacenamiento de los espermatozoides. El eflujo de colesterol estimulado por estas proteínas es dependiente del tiempo de exposición y de su concentración. De esta manera, la exposición continua del semen a BSP causaría una

remoción continua de colesterol desde la membrana plasmática, lo que puede dejar a los espermatozoides muy sensibles a las bajas temperaturas de almacenamiento (Bergeron y Manjunath, 2006). Al incubar espermatozoides previo a su enfriamiento a 5° C en metil – β – ciclodextrina cargada con colesterol, que actúa como un transportador que incorpora el colesterol a la membrana plasmática, se obtienen mejores valores de motilidad espermática e integridad de membrana tras 24 y 72 horas de almacenamiento (Torres *et al.*, 2006), lo que sugiere que una mayor concentración de colesterol en la membrana plasmática mejora las características anteriormente mencionadas. Este incremento en motilidad e integridad de membrana se hace evidente en mayor medida al criopreservar espermatozoides en un medio de congelación que contiene ciclodextrinas cargadas con colesterol (Spizziri *et al.*, 2010).

Otro de los elementos perniciosos presentes en el plasma seminal es una enzima, posiblemente producida por las glándulas bulbouretrales, con actividad similar a la lipasa. Esta enzima lipasa símil hidroliza triglicéridos liberando ácidos grasos, tales como el ácido oleico, que sería uno más de los mecanismos involucrados en la degradación de la calidad espermática, disminuyendo su motilidad, viabilidad e integridad acrosomal (Carver y Ball, 2002).

Tras el proceso de refrigeración, así como el de congelación, el espermatozoide aún debe ser capaz de pasar por el proceso de capacitación. Debe mantener la capacidad de adherirse al epitelio oviductal, ser liberado de éste cuando el ovocito llegue, ser motil durante la penetración del ovocito, ser capaz de sufrir una reacción del acrosoma oportuna y finalmente fusionarse con la membrana celular del ovocito (Crabo, 2001). Para lograr que el espermatozoide mantenga la capacidad de realizar los eventos mencionados anteriormente es que se han desarrollado distintos diluyentes de refrigeración de semen, existiendo en la actualidad una gran cantidad de diluyentes comerciales basados en distintos elementos para lograr la preservación adecuada de los espermatozoides.

Diluyentes de semen

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). Es por ello que se han evaluado una gran variedad de diluyentes de semen para su enfriamiento, almacenamiento y transporte. Los componentes han incluido variadas combinaciones de “buffers”, azúcares, electrolitos, proteínas, gelatinas, yema de huevo, leche y subproductos lácteos (Varner, 2003). Actualmente, la mayoría de los diluyentes de semen para dilución, centrifugación y almacenamiento de semen de potro refrigerado están basados en leche o yema de huevo. Son capaces de mantener características de motilidad y capacidad de congelación del semen por un período de alrededor de 24 (Aurich, 2006) a 72 horas tras mantenerse a 5° C (Pagl *et al.*, 2006). Dentro de los factores más importantes que afectan la longevidad del semen una vez diluido, se encuentran la calidad previa del semen, concentración espermática, tipo de diluyente, antibiótico(s) utilizado(s), tasa de dilución y la velocidad de enfriamiento (Samper, 2005).

Además del efecto de dilución del plasma seminal, los efectos positivos de los diluyentes se basan en el control del pH, osmolaridad y en la entrega de energía (Aurich, 2005).

Leche descremada

Para la preservación espermática, se ha utilizado leche descremada o leche entera, con las cuales el semen es diluido directamente y puede ser almacenado a 4° C o congelado en presencia de glicerol. El uso de leche descremada como diluyente de semen fue descrito inicialmente para la especie bovina, uso que se ha ido modificando con el paso del tiempo, pasando por leche esterilizada (Macpherson, 1960) y pasteurizada. Se han ido añadiendo

más componentes a la leche descremada comercial, generándose de esta manera los distintos diluyentes comerciales disponibles en la actualidad. La mayoría de los diluyentes comerciales, se basan en la fórmula descrita por Kenney en 1975 (Samper, 2005).

Ya que la leche descremada (libre de lípidos) es tan eficiente en su rol de protección espermática como la leche entera al almacenar semen a 4° C o al congelarlo, los lípidos aparentan no ser el constituyente responsable de la protección espermática entregada por la leche. Los constituyentes de la leche con mayor efecto protector aparentan ser las micelas de caseína. De hecho, se ha demostrado que micelas de caseína aisladas desde la leche pueden proteger semen de potro, chivo, carnero y toro durante su almacenamiento a 4 - 5° C. La leche filtrada, conteniendo sólo lactosa y minerales, no ofrece suficiente protección para los espermatozoides de potro durante su almacenamiento (Bergeron y Manjunath, 2006). Sin embargo, la adición de lactosa a un diluyente que contiene caseína mejora la eficiencia del diluyente durante el congelamiento de semen de toro. De esta manera, la lactosa parece mejorar la eficiencia del diluyente de semen, pero no es suficiente para proteger los espermatozoides por sí sola (Bergeron y Manjunath, 2006; Bergeron *et al.*, 2007).

Los diluyentes de leche descremada – glucosa contienen glucosa como fuente de energía para el espermatozoide, variadas proteínas de leche y carbohidratos que tienen un efecto fisiológico de “buffer” y protección celular. Las tasas de preñez pueden verse disminuidas en yeguas inseminadas con semen refrigerado al compararlas con semen fresco diluido. Una de las razones para esta disminución de fertilidad puede ser por cambios prematuros similares al proceso de capacitación, que pueden disminuir la longevidad espermática por la activación de procesos metabólicos celulares. Se sugiere que los espermatozoides se capacitan de manera prematura al incubarse en un diluyente de leche descremada y en el momento de la inseminación de una hembra pueden no fecundar el ovocito dado el compromiso de su función. La capacitación previa a la inseminación es detrimental, ya que los espermatozoides tienen disminuida su habilidad para alcanzar el ovocito, penetrar las células del cúmulo y unirse a la zona pelúcida (Pommer *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Akcay (2008) se demostró que, al mantener espermatozoides almacenados a una temperatura de 4° C, un diluyente en base a leche descremada con glucosa provee buena protección en cuanto a la viabilidad espermática e integridad de membrana, pero no para la motilidad. Por el contrario, al suplementar el diluyente de leche descremada con glucosa con un medio salino (medio de Tyrode), éste es más efectivo en cuanto a mantener la motilidad espermática, presumiblemente por su balance iónico (Padilla y Foote, 1991; Akcay, 2008). Resultados similares fueron obtenidos por Rota *et al.* (2004), quienes compararon tres diluyentes basados en leche descremada, de los cuales el que entregó mejores valores de motilidad y tasa de preñez fue un diluyente suplementado con medio de Tyrode y yema de huevo.

Rigby *et al.*, (2001) compararon la fertilidad de semen equino, medido como motilidad progresiva, diluido en una solución de leche descremada – glucosa con y sin adicionar un medio salino (medio de Tyrode) en presencia o ausencia de plasma seminal; no existieron diferencias significativas en la motilidad del semen diluido con solución de Tyrode y un 0% de plasma seminal respecto del semen diluido con un 20% de plasma seminal sin adicionar medio de Tyrode. De esto se puede concluir que al suplementar semen diluido en un medio de leche descremada – glucosa con una solución salina se puede prescindir del plasma seminal sin alterar las características de motilidad progresiva.

Pommer *et al.* (2002) compararon dos medios para incubar espermatozoides en cuanto a la ocurrencia de reacciones del acrosoma. Ambos medios eran diluyentes comerciales: uno de ellos se basaba en leche descremada adicionada con glucosa (SMG) y el otro estaba compuesto por medio de Tyrode, albúmina, lactato y piruvato (TALP). En el medio incubado con SMG se encontró una mayor proporción de reacciones del acrosoma, siendo también mayor la cantidad de calcio (Ca) intracelular presente en las células espermáticas en ese mismo medio. En ambos medios disminuyó considerablemente la motilidad total y la motilidad progresiva de los espermatozoides, siendo la disminución más marcada al incubar los espermatozoides con un ionóforo de Ca. Esto podría explicarse ya que el medio basado en SMG contiene hasta seis veces más Ca que un medio TALP, aumentando así el influjo de Ca hacia dentro de la célula.

El mecanismo preciso mediante el cual la leche descremada brinda protección al semen durante su almacenamiento se desconoce. Se cree que la leche contiene factores que son capaces de secuestrar las BSP que aumentan el eflujo de colesterol desde la membrana espermática. De esta manera, las BSP se unirían a estos elementos presentes en la leche, disminuyendo la proporción de estas proteínas unidas a la membrana espermática (Bergeron y Manjunath, 2006). En toros se ha demostrado que las micelas de caseína presentes en la leche descremada no se unen a la membrana espermática, sino que se unen a las BSP, previniendo de esta manera su unión con los espermatozoides. Así se evita la pérdida de lípidos desde la membrana espermática, preservando las características de motilidad y viabilidad durante su almacenamiento a 4° C (Bergeron *et al.*, 2007).

Se ha demostrado la existencia de un efecto antioxidante sobre el semen equino refrigerado ejercido por diluyentes basados en leche descremada. La dilución resulta en un aumento en la actividad de las enzimas GSH, SOD y CAT, que son enzimas antioxidantes que se encuentran presentes normalmente en el semen equino. El mismo efecto se observó en el plasma seminal diluido con leche descremada, pero no cuando los espermatozoides separados del plasma seminal fueron diluidos en leche descremada. Lo anterior sugiere que existiría una interacción positiva entre el plasma seminal y el diluyente, la cual aumenta la capacidad antioxidante, otorgando así una mayor protección de membrana espermática (Aurich, 2005). Esta interacción positiva entre plasma seminal y diluyente podría sugerir que ocurre un aumento en la peroxidación lipídica, siendo entonces el aumento en la actividad enzimática una respuesta al incremento de daño oxidativo (Kankofer *et al.*, 2005). Este aumento en la capacidad antioxidante no es un efecto netamente del diluyente, ya que este por sí solo carece de actividad antioxidante. Los diluyentes de leche descremada pueden contener cofactores o sustancias adicionales que influyen la capacidad antioxidante de las enzimas. Al remover un 90 – 95% de plasma seminal mediante centrifugación, se logró una compensación de la capacidad antioxidante no enzimática por parte de un diluyente basado en leche descremada – yema de huevo, a diferencia de la protección enzimática que no fue compensada por este diluyente (Bustamante Filho *et al.*, 2009). Esto sugiere que al centrifugar y remover la mayoría del plasma seminal, las enzimas antioxidantes son eliminadas y estas no son compensadas mediante la adición de

un diluyente de semen. Esto si ocurre con los antioxidantes no enzimáticos, cuya función se compensa con la adición del diluyente.

El principal problema de los diluyentes de semen basados en leche o yema de huevo es el hecho de que estos productos biológicos están compuestos por una variedad de sustancias. De esta manera, ellos no pueden ser estandarizados y pueden incluso variar entre lotes de un mismo producto. Además, sólo una determinada fracción puede ser necesaria para los efectos benéficos en la función espermática y otros componentes podrían incluso tener efectos detrimentales (Aurich, 2005; Pagl *et al.*, 2006).

El fraccionamiento de leche por diferentes métodos (microfiltrado, ultrafiltrado, congelado – secado) ha permitido aislar fracciones lácteas purificadas. De las fracciones aisladas, el fosfocaseinato y la β – lactoglobulina han demostrado ser las más efectivas para mantener la longevidad del semen refrigerado (Aurich, 2005). La fracción proteica presente en la leche descremada, constituida por caseína, fosfocaseinato y glicopéptidos de caseína, aumentan el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida al incubarlos junto con ovocitos in vitro (Coutinho da Silva *et al.*, 2004).

Al comparar un diluyente de leche descremada químicamente purificado, conteniendo caseinatos definidos y proteínas de suero, con un diluyente comercial basado en leche descremada, se preservó mejor la calidad del semen refrigerado en cuanto a parámetros de motilidad espermática, velocidad de desplazamiento e integridad de membrana. Esta diferencia se hizo más evidente en cuanto a motilidad espermática al mantener el semen refrigerado por más de 24 horas (Pagl *et al.*, 2006). Incluso diluyentes de semen conteniendo los mismos componentes (caseinatos definidos y proteínas de suero) varían en su capacidad para mantener la fertilidad espermática dependiendo del tratamiento previo al que se sometan, como por ejemplo si vienen constituidos o si su presentación es en polvo para constituir (Aurich *et al.*, 2007).

Dentro de las opciones de diluyente de semen basado en leche descremada, existen diferentes alternativas que varían desde las presentaciones comerciales preparadas hasta el

uso directo de leche descremada ultra pasteurizada. La mayoría de los diluyentes comerciales se basan en la fórmula documentada por Kenney en 1975 o variaciones de la misma, siendo la alternativa más económica la dilución directa con leche descremada previamente calentada en una proporción mínima de una parte de leche por una parte de semen (Blanchard *et al.*, 2003b).

En la realidad nacional el manejo de potros generalmente se realiza en el predio en que este reside, no teniendo acceso muchas veces a laboratorios ni a métodos específicos de procesamiento de semen. Es por esto que parece interesante evaluar el uso de un diluyente de semen que contenga sólo leche descremada en caballos pura sangre chileno, evaluando su capacidad de mantener la motilidad espermática y comprobar si existen diferencias significativas asociadas a las distintas marcas de leche descremada disponibles en el comercio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto protector de leches descremadas comerciales como diluyentes de refrigeración de semen equino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de leches descremadas comerciales disponibles en Chile sobre la motilidad espermática.
2. Comparar las distintas leches descremadas comerciales en sus efectos sobre la refrigeración de semen en sus características de motilidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se efectuó en el centro de Reproducción y Fertilidad equina BIOTEQ ubicado en la comuna de Curacaví, Región Metropolitana, Chile.

Se utilizaron un total de cuatro padrillos pura sangre chileno de entre cinco y 15 años de edad, de fertilidad comprobada, que se definió como el logro de preñeces a la primera monta en temporadas pasadas y se basó en las sucesivas evaluaciones espermáticas realizadas a dichos padrillos con anterioridad en BIOTEQ. Se realizaron dos extracciones de semen semanales a cada semental hasta lograr un número de cuatro eyaculados por padrillo. El reposo sexual entre cada extracción no fue el mismo para todos los potros, ya que dependía del programa de montas individual de cada padrillo. Para la monta del macho, se utilizó una yegua en celo. La extracción de semen se realizó mediante el uso de una vagina artificial modelo Missouri ® (Enasco, Estados Unidos), tamaño estándar de 16 pulgadas, previamente calentada con agua a 50° C y protegida en su interior con una camisa sanitaria lubricada con gel estéril no espermicida priority care (ARS, Estados Unidos). Previo a la extracción de semen, el pene de cada padrillo fue lavado con agua tibia y secado con toallas de papel.

Las leches descremadas fueron extraídas de sus envases originales mediante jeringas estériles y almacenadas en tubos Falcon de 30 ml. Cada tubo fue rotulado con su respectiva marca y congelado. Al momento de utilizar la leche descremada para diluir cada eyaculado, un tubo de cada marca fue seleccionado y puesto a descongelar en baño termo regulado a 37° C durante 30 minutos. Para este estudio, se consideraron cuatro marcas distintas de leches descremadas comerciales: Colun ®, Loncoleche ®, Soprole ® y Surlat ®. Dentro de cada marca de leche se utilizaron cajas pertenecientes al mismo lote de producción. En la tabla 1 se encuentra la composición nutricional de cada marca de leche descremada utilizada en el presente estudio.

TABLA 1: composición nutricional entregada por el fabricante de las leches descremadas consideradas en el presente estudio.

	Colun	Loncoleche	Soprole	Surlat
Fecha vencimiento	06.05.2010	08.07.2010	21.06.2010	08.06.2010
Energía (Kcal)	33	33	32	33
Proteína (g)	3,45	3,0	3,0	3,1
Grasa total (g)	0,05	0,1	0,1	0,1
Colesterol (mg)	0,16		2,1	
Hidratos de Carbono (g)	4,7	5	4,7	4,9
Sodio (mg)	60	80	68,7	44
Calcio (mg)	115	123	104	124

Una vez obtenido el eyaculado, éste fue inmediatamente filtrado con un filtro de celulosa maxflow (Enasco, Estados Unidos) para separar la fracción gel y cualquier detrito o elemento extraño existente de la fracción más rica en espermatozoides. Una vez filtrado fue vertido en un vaso precipitado previamente calentado a 37° C. Los valores de volumen total y volumen libre de gel fueron registrados para cada eyaculado y cada padrillo. Aproximadamente cinco minutos tras cada extracción de semen se tomó 1 ml de cada eyaculado mediante pipetas Pasteur desechables (Continental Plastics, Estados Unidos), en que fueron evaluados los parámetros de concentración espermática, motilidad total o de masa y motilidad progresiva, siendo esta evaluación considerada como la evaluación a tiempo cero (T₀). La concentración espermática se evaluó por medio de un contador de células ARS System 490a (ARS, Estados Unidos). Los parámetros de motilidad total y motilidad progresiva fueron evaluados de manera subjetiva por un mismo observador mediante microscopio de contraste de fases CX – 31 (Olympus, Japón) con un aumento de 100X. Se depositó 1 ml de semen sobre un portaobjetos, cubierto con un cubreobjetos y se evaluaron 10 campos por muestra para calcular el promedio de motilidad total y progresiva de la muestra.

Tras la evaluación seminal en T_0 , cada eyaculado fue fraccionado en cuatro partes, para luego diluir cada fracción con una de las cuatro distintas leches descremadas comerciales. El volumen de leche a utilizar para diluir dependió de la concentración espermática de cada muestra, ya que cada fracción del eyaculado se diluyó con leche de manera tal de lograr una concentración de 50 millones de espermatozoides por ml de solución.

La mezcla de leche descremada y semen se realizó en tubos Falcon estériles de 15 ml calentados a 37° C en una estufa de cultivo, agitando suavemente. Una vez homogeneizada la muestra, estos tubos se sumergieron en un vaso precipitado con agua a 37° C, el cuál fue almacenado conteniendo los tubos directamente en un refrigerador convencional a 5° C. Estas muestras se mantuvieron en refrigeración hasta 72 horas. Tras las 72 horas de almacenamiento todas las muestras de semen fueron eliminadas.

Se repitieron evaluaciones de motilidad total y motilidad progresiva cada 24 horas desde el T_0 (primera evaluación) hasta las 72 horas, como la cuarta y última evaluación. Para estas evaluaciones se tomó 1 ml de cada dilución de semen, que fue retirada de refrigeración y puesta directamente sobre un portaobjetos calentado en una platina térmica (Thermolyne, Estados Unidos) a 37° C. La muestra sobre el portaobjetos se mantuvo cinco minutos sobre la platina antes de ser evaluada. Las evaluaciones fueron realizadas cada vez por el mismo observador, de modo de intentar disminuir el error asociado a la evaluación microscópica subjetiva.

Las diferencias que pudiesen existir entre potros, entre los distintos eyaculados y entre las distintas leches descremadas comerciales fueron medidas mediante un análisis de varianza en parcelas divididas o *split plots*, en que se consideró el tiempo de refrigeración de cada muestra y la leche descremada comercial con la cual cada eyaculado fue diluido.

Las variables a evaluar para cada tratamiento fueron el porcentaje de motilidad progresiva y el porcentaje de motilidad total. Las dos evaluaciones se realizaron de acuerdo al siguiente modelo estadístico:

$$\gamma_{ijk} = \mu + a_{i=4} + b_{j=3} + c_{k=4} + ab + ac + bc + abc + e$$

En este modelo γ corresponde al porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva en cada modelo (respectivamente), **a** corresponde al efecto de los distintos tratamientos, **b** al tiempo almacenado en refrigeración, **c** al efecto individual de cada padrillo, μ a la media poblacional y **e** al error del modelo. Las interacciones que pudiesen existir entre los primeros tres factores (a, b y c) corresponden a **ab**, **ac**, **bc** y **abc**.

Para el análisis de los datos, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un $p < 0,05$. Los resultados fueron analizados mediante el programa computacional InfoStat (Balzarini *et al.*, 2008).

Para expresar los resultados se utilizaron las siguientes abreviaciones: T se refiere a los tiempos en que se realizaron las mediciones: evaluación una vez obtenido el eyaculado (T_0), a las 24 (T_1), 48 (T_2) y 72 (T_3) horas de refrigeración respectivamente. En cuanto a las leches descremadas, estas fueron ordenadas alfabéticamente, correspondiendo la leche 1 a Colun®, la leche 2 a Loncoleche®, la leche 3 a Soprole® y la leche 4 a Surlat®.

RESULTADOS

Los resultados promedios para cada potro se encuentran en las tablas 2 y 3, para motilidad total y motilidad progresiva, respectivamente. Los valores de cada eyaculado en cada tiempo de refrigeración se encuentran en las tablas 8 y 9 en el anexo.

TABLA 2: valores de motilidad total.

	T ₀				T ₁				T ₂				T ₃			
	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Potro 1	82,5	82,5	82,5	82,5	60	48,8	65	52,5	43,8	28	47,5	38,8	25	5	27,5	16,3
Potro 2	65	65	65	65	40	23,8	41,3	20	16,3	5	12,5	6,3	1,3	0	1,3	0
Potro 3	77,5	77,5	77,5	77,5	52,5	35	53,8	35,0	26,3	15	32,5	22,5	11,3	5	12,5	2,5
Potro 4	82,5	82,5	82,5	82,5	55	43,8	60	52,5	38,8	29	41,3	23,8	17,5	13,8	22,5	13,8

L1, L2, L3 y L4: leche marca 1, marca 2, marca 3 y marca 4 respectivamente.

T₀, T₁, T₂, T₃: tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 respectivamente.

TABLA 3: valores de motilidad progresiva.

	T ₀				T ₁				T ₂				T ₃			
	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
Potro 1	63,8	63,8	63,8	63,8	42,5	32,5	52,5	37,5	23,8	10	31,3	20	8,9	0	13,8	3,8
Potro 2	42,5	42,5	42,5	42,5	22,5	7,5	23,8	6,3	5	0	2,5	0	0	0	0	0
Potro 3	58,8	58,8	58,8	58,8	40	20	37,5	18,8	8,9	2,5	17,5	5	1,3	0	5	0
Potro 4	68,8	68,8	68,8	68,8	43,8	18,8	35	32,5	20	8,8	25	12,5	3,8	2,5	7,5	2,5

L1, L2, L3 y L4: leche marca 1, marca 2, marca 3 y marca 4 respectivamente.

T₀, T₁, T₂, T₃: tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 respectivamente.

Los valores para todos los potros obtenidos en la evaluación de semen fresco (promedio \pm desviación estándar) fueron $116,3 \pm 41,2$ ml para volumen total de semen; $76,3 \pm 36$ ml para volumen libre de gel; $151,7 \pm 54 \times 10^6$ espermatozoides por ml para concentración espermática; $76,9 \pm 8,3$ % para motilidad total y $57,8 \pm 11,4$ % para motilidad progresiva. Los valores individuales para cada padrillo en la evaluación en fresco se encuentran en la tabla 4.

TABLA 4: valores de evaluación en fresco para cada potro.

	Potro 1	Potro 2	Potro 3	Potro 4
Volumen total (ml)	75	135	132,5	122,5
Volumen libre de gel (ml)	61,3	42,5	112,5	88,8
Concentración espermática (10^6 espermatozoides por ml)	200,3	162,8	123	120,8
Motilidad total (%)	82,5	65	77,5	82,5
Motilidad progresiva (%)	63,8	42,5	58,8	66,3

Para el porcentaje de motilidad total todos los factores incluidos en el modelo ($p < 0,05$) (tiempo, leche y potro) afectaron la variable. Además, hubo interacción significativa entre tiempo y leche, siendo las demás interacciones no significativas estadísticamente. Para el porcentaje de motilidad progresiva todos los factores incluidos en el modelo también afectaron la variable. En esta evaluación, hubo interacciones significativas entre tiempo y leche, y entre tiempo y potro, sin que las otras interacciones fueran estadísticamente significativas.

Los resultados de diferencias entre potros se encuentran en la tabla 5. Se registraron diferencias significativamente estadísticas ($p < 0,05$) para motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) entre los distintos individuos. Los potros 1 y 4 presentaron los mejores valores para ambas evaluaciones, no presentando diferencias estadísticamente significativas tanto para valores de MT como para valores de MP. Los potros 2 y 3 difirieron estadísticamente entre ellos y entre los potros 1 y 4, siendo el menor valor para ambas variables obtenido por el individuo 2.

TABLA 5: valores de motilidad total y motilidad progresiva para cada potro.

Potros	n	Medias MT		Medias MP	
1	64	49.22	a	33.05	a
2	64	26.72	b	14.69	b
3	64	38.36	c	24.45	c
4	64	46.02	a	30	a

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los resultados de diferencias entre leches se encuentran en la tabla 6. Las leches 1 y 3 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tanto para valores de MT como de MP. Lo mismo se repitió con las leches 2 y 4. Existieron diferencias significativas entre las leches 1 y 3 al compararlas con las leches 2 y 4, siendo los valores inferiores los pertenecientes a las leches de marca 2 y 4.

TABLA 6: valores de motilidad total y motilidad progresiva para cada marca de leche.

Leche	n	Medias MT		Medias MP	
1	64	43.44	a	27.89	a
2	64	34.92	b	21.02	b
3	64	45	a	30	a
4	64	36.95	b	23.28	b

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los resultados de diferencias a lo largo del tiempo se encuentran en la tabla 7. Los resultados de MT y de MP fueron diferentes estadísticamente ($p < 0,05$) en todos los tiempos. Se presentaron los mayores valores a T_0 , disminuyendo paulatinamente hasta T_3 , momento en que se presentaron los valores más bajos para ambas variables.

TABLA 7: valores de motilidad total y motilidad progresiva para cada tiempo de refrigeración.

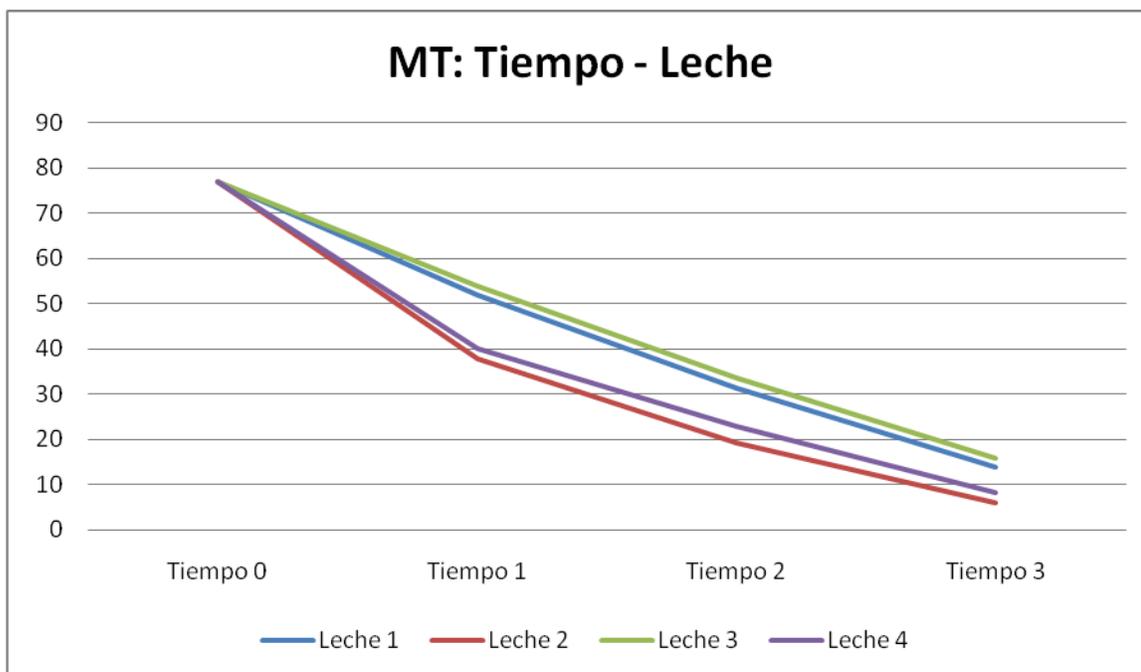
Tiempo	n	Medias MT	Medias MP
0	64	76.88 a	58.44 a
1	64	45.86 b	28.67 b
2	64	26.64 c	12.03 c
3	64	10.94 d	3.05 d

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Las interacciones se encuentran en las figuras 1, 2 y 3. Como se mencionó con anterioridad, para MT existió interacción sólo entre leche y tiempo. Para MP se encontraron interacciones significativas entre leche y tiempo, y entre tiempo y potro. Las demás interacciones no fueron significativas estadísticamente ($p < 0,05$).

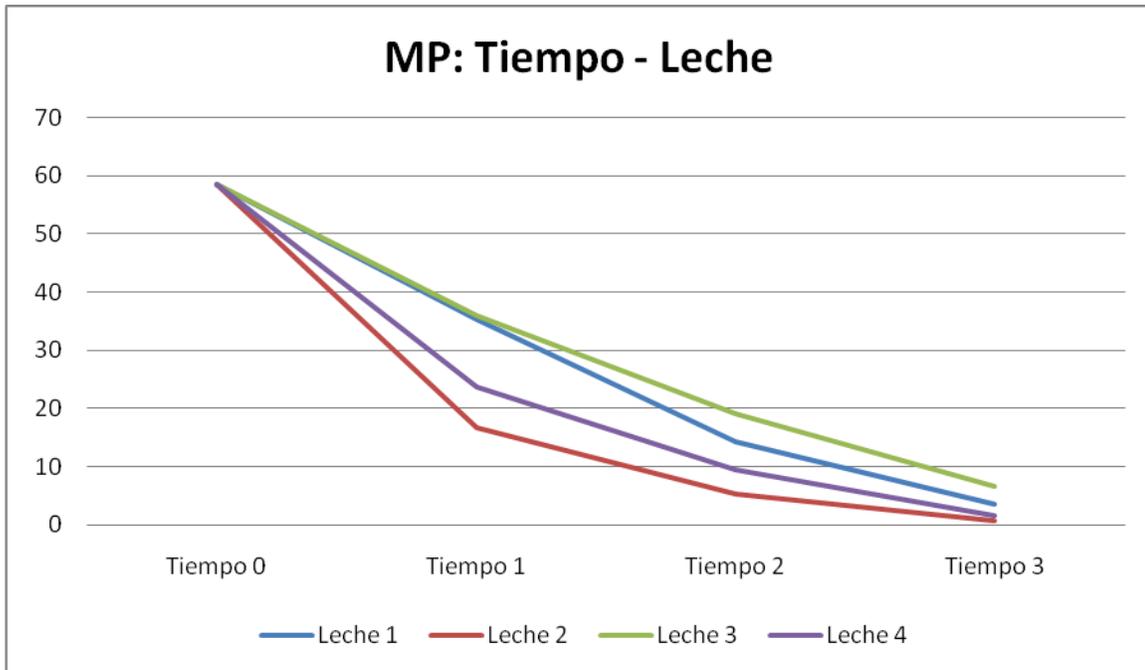
La interacción entre leche y tiempo para el parámetro de MT se encuentra detallada en la tabla 10 (ver anexo) y en la figura 1. En T_0 no hubo diferencias entre las distintas marcas de leche descremada y sus valores de MT fueron los mayores. Los valores de motilidad total fueron disminuyendo progresivamente en el tiempo para todas las marcas de leche. En T_1 y T_2 los mejores valores fueron obtenidos por las leches 1 y 3, sin diferencias entre ellas, y los valores más bajos fueron para las leches 2 y 4, sin diferencias entre ellas. La diferencia entre ambos grupos fue tal, que los valores obtenidos por las leches 2 y 4 en T_1 no tuvieron diferencias significativas con los valores de las leches 1 y 3, 24 horas después (en T_2). En T_3 todas las marcas de leche presentaron los menores valores, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

FIGURA 1: Interacción existente entre tiempo y leche para el parámetro de MT.



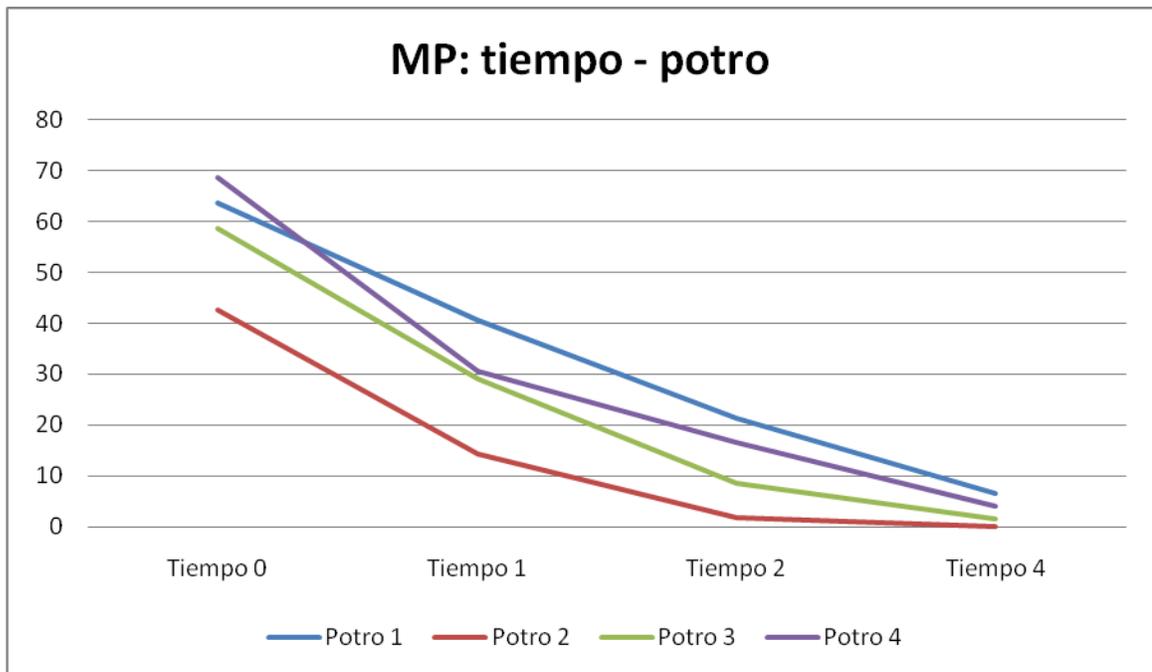
La interacción existente entre tiempo y leche para MP se encuentra detallada en la tabla 11 (ver anexo) y en la figura 2. No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas mediciones a T_0 . Al igual que lo observado para MT, los mayores valores fueron obtenidos en T_0 , los que fueron disminuyendo progresivamente en el tiempo para todas las leches estudiadas. En T_1 y T_2 los valores más altos fueron obtenidos por las leches 1 y 3, sin diferencias entre ellas, y los valores más bajos fueron para las leches 2 y 4, sin diferencias entre ellas. Al igual que lo ocurrido para MT, en T_1 y T_2 los valores de las leches 2 y 4 no tuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con los valores obtenidos por las leches 1 y 3, 24 horas más tarde. En T_3 se presentaron los valores más bajos para todas las leches estudiadas, sin diferencias ($p < 0,05$) entre ellas ni entre los valores de las leches 2 y 4 en T_2 .

FIGURA 2: interacción existente entre tiempo y leche para el parámetro de MP.



La interacción existente entre tiempo y potro para la variable de MP se encuentra detallada en la tabla 12 (ver anexo) y en la figura 3. Todos los machos presentaron los mejores valores de MP en T₀, los que fueron disminuyendo progresivamente hasta T₃, en que se obtuvieron los menores valores. Para esta interacción, en T₀ los potros 1 y 4 presentaron los mayores valores de MP, sin existir diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos. Los potros 1 y 3 obtuvieron los menores valores, sin presentar diferencias significativas entre ellos. El potro 2 en la medición en este tiempo presentó el menor valor, difiriendo de todos los demás individuos. El potro 1 obtuvo los mejores valores de MP en T₁, T₂ y T₃, siendo los peores valores obtenidos por el potro 2 en todas las evaluaciones, llegando incluso a obtener valores de cero en las evaluaciones en T₃. Los potros 3 y 4 no presentaron diferencias entre ellos en T₁ ni T₂, obteniendo valores intermedios al compararlos con los potros 1 y 2. En T₃ no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los machos de este estudio, sin diferencias entre ellos y entre los potros 2 y 3 en sus evaluaciones en T₂.

FIGURA 3: interacción existente entre tiempo y potro para el parámetro de MP.



DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontraron diferencias de motilidad entre las distintas marcas de leches comerciales estudiadas, por lo que sería importante elegir determinadas características de la leche, en el momento de requerir diluir semen con leche descremada. Las marcas que lograron mantener mejores características espermáticas correspondieron a Colun® y Soprole®, siendo Loncoleche® y Surlat® las que mantenían por un menor período de tiempo la motilidad espermática.

Varner (2008), postula que los valores de motilidad en el semen fresco que debieran tener los potros para considerarse fértiles no debieran ser inferiores a 80% para MT y 63% para MP. De acuerdo con el mismo autor, los animales considerados sub fértiles serían aquellos con valores de MT inferiores a 63% y de MP inferiores a 48%. En el presente estudio los valores obtenidos indicaría que están levemente bajo el promedio esperado para padrillos fértiles, pero por sobre los valores promedios considerados para padrillos subfértiles. Hay que considerar que uno de los potros incluido en el estudio, el potro 2, presentó valores inferiores al compararlos con los demás padrillos (valores de motilidad total que variaron entre 60 y 70% y valores de motilidad progresiva que variaron entre 30 y 50%). Este es el único potro que según los valores considerados por Varner (2008) sería subfértil, ya que los demás sementales presentaron valores de MT y MP acordes a los de un potro fértil. Este padrillo presentó los menores valores tanto de MT como de MP en todos los tiempos y en todas las leches, lo que podría deberse a la deficiente calidad del semen fresco o a que el semen de este potro sea intolerante al frío (*“bad cooler”*), ya que el potro era considerado fértil al realizar montas naturales.

En este estudio la principal fuente de variación para MT y MP fue el tiempo de almacenamiento, siendo la segunda fuente de variación el macho. Esto coincide con lo reportado por varios autores con anterioridad (Padilla y Foote, 1991; Sieme *et al.*, 2004; Aurich, 2006; Akcay *et al.*, 2006; Bozkurt *et al.*, 2007), en que la principal fuente de variación correspondió al macho al comparar en semen fresco. Esta gran diferencia entre padrillos es atribuible en parte a la diferencia en la composición del plasma seminal que se

describe para los distintos machos (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). Dentro de las diferencias existentes en el plasma seminal de los padrillos se encuentran, por ejemplo, diferencias significativas en la actividad de la catalasa endógena presente en el plasma seminal (Ball *et al.*, 2001), lo que influye en la capacidad antioxidante propia de cada ejemplar. Además, existen diferencias individuales entre machos de una misma especie en los niveles de colesterol presentes en su membrana espermática (Cross, 1998).

Dentro de los machos utilizados en este estudio, el macho número 3 realizaba varias montas antes de eyacular. Un mayor número de montas resulta en un mayor volumen seminal (mayor aporte por parte de las glándulas sexuales anexas), menor concentración espermática y menor MP tras su almacenamiento refrigerado por 24 horas, aún cuando no existan diferencias en la MP a la evaluación en fresco ni en el número total de espermatozoides por eyaculado (Sieme *et al.*, 2002; Sieme *et al.*, 2004). Además, múltiples montas utilizando la misma vagina artificial aumentan la cantidad de fluido pre seminal y de contaminantes presentes en el semen recolectado (Loomis, 2006; Sieme *et al.*, 2002). Estos factores mencionados anteriormente podrían ser en parte responsables de los bajos valores de motilidad obtenidos por este padrillo tras la refrigeración de sus eyaculados, aún cuando sus valores en la evaluación en fresco fueron los de un potro fértil (MT de 77,5% y MP de 58,7%). Sieme *et al.*, (2004) obtuvieron valores de MP significativamente distintos tras almacenar semen por 24 horas a 5° C en un diluyente comercial basado en leche descremada de potros que lograban la eyaculación tras una, dos o más de tres montas. Si bien los valores de MP no presentaron diferencias antes de ser refrigerados, tras 24 horas de refrigeración la MP en los potros que eyaculaban tras tres o más montas fue significativamente menor que en los padrillos que eyaculaban durante la primera o segunda monta, lo que coincide con los datos obtenidos en el presente trabajo.

En el presente estudio la MT tras 24 horas de refrigeración fue en promedio de 45%. Obviando los datos pertenecientes al potro que presentó los menores valores de motilidad espermática inicial, el promedio de MT sube a 50%. En distintos estudios los valores de MT fueron superiores a los obtenidos en el presente estudio: Padilla y Foote (1991) obtuvieron un 52% de MT al almacenar en medio de Kenney y 62% en medio de Kenney

suplementado con Tyrode; Bozkurt *et al.* (2007) obtuvieron MT de 67% en diluyente basado en leche descremada (adicionado con glucosa, bicarbonato de Na, sulfato de polimixina B, agua destilada). Otros de los estudios de motilidad obtuvieron valores inferiores a los obtenidos: Pagl *et al.* (2006) obtuvieron valores de MT de 13% al diluir en medio de Kenney y de 21% al diluir en un diluyente de proteínas definidas de leche adicionado con azúcares y glicina (DMP); Avanzi *et al.* (2006) obtuvieron valores que fluctuaron entre 23% y 81,6% de MT en un diluyente basado en leche descremada adicionado con glucosa (SMG); Rota *et al.* (2004) obtuvieron valores de 38% de MT al diluir en SMG y 72% con SMG más yema de huevo. Estas marcadas variaciones pueden deberse al uso de distintos diluyentes (todos basados en leche descremada) y en el caso del estudio de Avanzi *et al.*, (2006) se utilizaron distintos métodos de disminución de temperatura. La MT obtenida en este estudio es inferior a varios de los estudios realizados con anterioridad (Padilla y Foote, 1991; Bozkurt *et al.*, 2007); esto puede deberse a la composición de los diluyentes utilizados, ya que se utilizó en este estudio sólo leche descremada, sin adicionar otros elementos (antibióticos, azúcares, soluciones salinas, etc.). Meirelles *et al.* (1998) diluyeron semen de potros con leche descremada como único componente, obteniendo valores de MT tras 24 horas de refrigeración de 33,6%; siendo superior el valor obtenido en el presente estudio. Los espermatozoides diluidos sólo con leche descremada se encuentran más expuestos a disminuir su calidad espermática por la ausencia de algunos elementos protectivos de los espermatozoides. Aún así, los valores que se obtuvieron fueron mejores que los descritos por algunos autores (Pagl *et al.*, 2006; Avanzi *et al.*, 2006; Rota *et al.*, 2004), lo que puede deberse a una mejor calidad inicial del semen de estos machos o a que sean más tolerantes al frío que los machos en que se obtuvieron valores inferiores.

En cuanto a la MP, los valores obtenidos tras 24 horas de almacenamiento fueron cercanos a 30%. Al obviar los datos del potro con menores valores de motilidad espermática inicial se obtuvo un valor superior (cercano a 34%) Al igual que lo ocurrido con la MT, hay bastante variación entre los resultados obtenidos en distintos estudios de refrigeración de semen equino, los que a su vez utilizaban distintos diluyentes de semen. Tharasanit *et al.* (2007) obtuvieron MP de 58% al diluir en un medio de Kenney

modificado; Avanzi *et al.* (2006) obtuvieron valores que variaron entre 20 y 72% en un diluyente de SMG; Bruemmert *et al.* (2002) obtuvieron valores de MP 31,2% al diluir en un medio de SMG; Rota *et al.* (2004) obtuvieron valores de MP de 20% al diluir en SMG y 40% al diluir en SMG adicionada con yema de huevo; Pagl *et al.* (2006) obtuvieron valores de MP de 23% al diluir en medio de Kenney y de 35% en DMP; Meirelles *et al.* (1998), obtuvieron valores de MP de 15,6% tras 24 horas de refrigeración en leche descremada, siendo los valores obtenidos inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Las variaciones entre estudios, al igual que con lo ocurrido en MT, pueden deberse a los distintos tipos de diluyente utilizado, a la motilidad inicial que presentaron los machos incluidos en los estudios o a la capacidad individual del semen de cada padrillo de sobrevivir a la baja temperatura de almacenamiento.

Los parámetros de MT y MP tuvieron un comportamiento similar al anteriormente descrito al evaluarlo tras 48 y 72 horas de refrigeración. En la literatura existen estudios en que se obtienen valores superiores e inferiores a los descritos en el presente estudio (Padilla y Foote, 1991; Meirelles *et al.*, 1998; Bruemmert *et al.*, 2002; Pagl *et al.*, 2006; Tharasanit *et al.*, 2007; Bozkurt *et al.*, 2007). En este trabajo, el valor de MT tras 48 horas fue de 26,2%. Al evaluar los valores obtenidos de MT tras 72 horas, y los valores de MP tras 48 y 72 horas, el modelo no se vuelve aplicable, ya que la desviación estándar arroja valores mayores a los del promedio. Al obviar los valores obtenidos por el potro 2, el modelo es aplicable para MT a las 72 horas y MP a las 48 horas; pero sigue sin ser aplicable para MP a las 72 horas. Probablemente esto se debe a que el potro 3 obtuvo en varias de las evaluaciones tras 48 y 72 horas de refrigeración valores de MT y MP de 0%, generando importantes variaciones en el promedio. Tras 72 horas de refrigeración, se obtuvieron eyaculados de todos los potros con valores de MP de 0%, lo que nuevamente genera grandes variaciones en el promedio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son inferiores a los que se han obtenido al refrigerar o congelar semen de otras especies (Cross, 1998). Los espermatozoides de la especie humana, conejos y monos bastante menos sensibles al shock térmico, lo que podría explicarse por su alta proporción de colesterol / fosfolípidos en su

membrana espermática y por su alto contenido de ácidos grasos saturados al comparar con especies con mayor susceptibilidad a la injuria por bajas temperaturas (toro, carnero, verraco y en mayor medida el potro) (Muiño - Blanco *et al.*, 2008). La proporción colesterol / fosfolípidos (en base molar) es de 0,83 en humanos; 0,43 en carnero; 0,40 en toro y 0,36 en potros (Cross, 1998). Es esta proporción de los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana espermática la que influencia las propiedades físicas de la misma, modificando su fluidez, permeabilidad y temperatura a la cuál ocurre el cambio de fase de sus fosfolípidos (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). Está demostrado que las especies que poseen bajos niveles de colesterol en su membrana plasmática (por lo tanto una menor proporción colesterol / fosfolípidos) tienen menor resistencia al shock térmico que otras especies con altos niveles de colesterol en su membrana (Bergeron y Manjunath, 2006). Esto se ratifica en los estudios de Torres *et al.*, (2006) y Spizziri *et al.* (2010); en ambos estudios se obtuvieron mejores características de sobrevivencia, motilidad e integridad de membrana espermática al aumentar el contenido de colesterol en la membrana plasmática de espermatozoides de potro; manteniendo su capacidad de capacitarse y sufrir reacción del acrosoma. El porcentaje de lípidos presente en la membrana espermática del potro es de 57% de fosfolípidos, 37% de colesterol y 6% de glicolípidos (Gadella *et al.*, 2001a).

Al comparar los valores obtenidos por los distintos potros en sus características de MT y MP tras 24, 48 y 72 horas de refrigeración, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas marcas de leche descremada analizadas en este estudio. Como se mencionó con anterioridad, las leches que preservaron de mejor manera el semen de potro correspondieron a Colún® y Soprole®, sin que existan diferencias significativas entre ambas. La existencia de diferencias entre distintas marcas de leche descremada puede explicarse en parte a su distinta composición nutricional (nivel de colesterol, de energía, de Ca). Cuando hay altos niveles de Ca en el medio, se acelera el proceso de capacitación prematura de los espermatozoides, lo que lleva a una disminución en su viabilidad (Mcniven y Richardson, 2006). Al incubar espermatozoides en un medio adicionado con colesterol, se previene la capacidad de los espermatozoides de sufrir reacción del acrosoma o de fecundar un ovocito. Al incubar los espermatozoides en un medio que posee colesterol en la misma proporción que este se va perdiendo desde la membrana espermática el número de

espermatozoides con reacción del acrosoma prematura se vio disminuido (Cross, 1998). En cuanto a los niveles de Ca, las leches que presentaron los menores valores de Ca fueron las que mantuvieron de mejor manera la motilidad de los distintos potros (tabla 3), siendo las leches 2 y 4 las que mantuvieron por menor tiempo la MT y MP, las que a su vez presentaron los mayores niveles de Ca. El colesterol también variaba entre las distintas leches, pero sus valores no estaban especificados para las marcas de leche 2 y 4, pudiendo ser en parte responsable de la diferencia entre las marcas. En cuanto a los niveles de energía, no se presentaba diferencia en las distintas marcas de leche. Los niveles de proteína también presentaron diferencias entre marcas, pero estas diferencias no se vieron reflejadas en la calidad de motilidad obtenida. Las leches con menores valores de proteína (leches 2 y 3) fueron las leches que preservaron durante mayor y menor tiempo los espermatozoides, lo que podría indicar que las diferencias existentes en los niveles de proteína no son lo suficientemente marcadas, y que existen otros factores además de la calidad proteica que podría estar generando las diferencias entre leches.

Los 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 resultados obtenidos por Aurich y Spersger (2007) indicaron que solamente *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* produjeron disminución en la motilidad espermática tras su almacenamiento a 5° C en un diluyente de leche descremada sin adicionar antibióticos, no afectándose la motilidad frente a *Streptococcus equi* subespecie *equi*, *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* ni *Staphylococcus aureus*. De esta manera, la carencia de antibióticos en el presente estudio podría considerarse de importancia dependiendo del tipo de bacteria que contamine el semen, situación que podría confirmarse mediante un estudio microbiológico.

Para inseminar se requiere una dosis de 500 a 1000 millones de espermatozoides motiles (Carnevale y Coutinho da Silva, 2005; Loomis, 2006; Vanderwall, 2008). Para

obtener este valor, la concentración espermática total debe corregirse por la MP, de manera de obtener el valor de espermatozoides con capacidad fecundante. Es por la dosis de inseminación necesaria que eyaculados que tras su almacenamiento presenten valores de MP inferiores al 30% van siendo descartados para su uso en IA, ya que se necesitaría de una concentración espermática y un volumen de semen muy grande para lograr tasas de preñez satisfactorias al realizar una IA estándar (Loomis, 2006). De esta manera, con los valores obtenidos en el presente estudio el semen mantendría características de MP necesarias para inseminar durante un período de tiempo de 24 horas en la mayoría de los casos, y de 48 horas al diluir en las leches 1 y 3 con los potros 1 y 4. La concentración espermática promedio obtenida fue de $151,7 \pm 54$ millones de espermatozoides por ml de solución. Para una dosis promedio de 750 millones y la corrección por el promedio de MP (58,4%), en T_0 se necesitarían 8,6 ml de semen fresco por dosis de inseminación. Al refrigerar por 24 horas se necesitaría en promedio 17,2 ml por dosis de inseminación (MP promedio de 28,9%). Al refrigerar por 48 horas, con el valor promedio de MP (9,6%) se debería utilizar una dosis de inseminación de 51,7 ml; volumen que incluso podría no ser suficiente con el eyaculado completo. Cuando fueron considerados los eyaculados de los potros 1 y 4 diluidos con las leches 1 y 3, las dosis de inseminación corregidas por la MP obtenida para estas mediciones son de 16 ml para el potro 1 y de 27 ml para el potro 2. Estos valores obtenidos coinciden con lo reportado por otros autores (Padilla y Foote, 1991; Aurich, 2006) quienes sostienen que el semen de potro refrigerado a 5° C mantendría una adecuada motilidad y fertilidad de los espermatozoides durante alrededor de 24 horas de almacenamiento.

El presente estudio indica que 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. El uso de diluyente de leche descremada resulta bastante útil a nivel de terreno, ya que generalmente la obtención de semen en potros se realiza en el mismo predio, con lo que se podría mantener la capacidad fecundante de semen sin la necesidad de contar con un laboratorio.

CONCLUSIONES

- El uso de leche descremada comercial como diluyente de refrigeración de semen equino brinda resultados satisfactorios de motilidad durante su almacenamiento por alrededor de 24 horas a 5° C.
- El congelamiento de leche descremada comercial y su descongelamiento previo a su uso permite mantener características de motilidad al mantener semen diluido refrigerado por alrededor de 24 horas a 5° C.
- Existen diferencias entre las distintas marcas de leche descremada consideradas en el presente estudio, por lo que es importante la elección de una determinada marca (o características lácteas) al momento de diluir semen equino.
- El uso de marcas de leche con las características lácteas mencionadas para Colún ® y/o Soporole ® mantienen mejores características de motilidad; permitiendo ampliar el uso de semen refrigerado hasta alrededor de 48 horas de refrigeración a 5° C.

BIBLIOGRAFÍA

AKCAY, E. 2008. The effect of seminal plasma, skim milk and Tyrodes solutions on survival of stallion sperm stored at 4°C. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32: 379 – 384.

AKCAY, E.; REILAS, T.; ANDERSSON, M. y KATILA, T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J. Vet. Med. A.* 53: 481 – 485.

AURICH, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled – stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 65 – 75.

AURICH, C. 2006. Advances in artificial insemination. In: Proceedings of the 9th international congress of world equine veterinary association: 22 al 26 de Enero del 2006. Marrakech, Marruecos. pp. 230 – 234.

AURICH, C.; SEEBER, P. y MÜLLER – SCHLÖSSER. 2007. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 445 – 448.

AURICH, C. y SPERGSER, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled – stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67: 912 – 918.

AVANZI, B.; FARRÁS, M.; MELO, C.; ALVARENGA, M.; DELL' AQUA, J.; MEDEIROS, A.; ARAÚJO, G. y PAPA, F. 2006. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 152 – 154.

BALL, B. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 257 – 267.

BALL, B. y VO, A. 2002. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁ – BODIPY^{581/591}. *J. Androl.* 23: 259 – 269.

BALL, B.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C. y BAUMBER, J. 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 56: 577 – 589.

BAUMBER, J.; BALL, B.; GRAVANCE, C.; MEDINA, V. y DAVIES – MOREL, M. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21: 895 – 902.

BERGERON, A. y MANJUNATH, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1338 – 1344.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P. y MANJUNATH, P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77: 120 – 126.

BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; CASANOVES, F.; DI RIENZO, J. y ROBLEDO, C. 2008. *InfoStat, Manual del usuario.* Argentina, Brujas.

BLANCHARD, T.; VARNER, D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.; BRINSKO, S. y RIGBY, S. 2003a. Examination of the stallion for breeding soundness. *In: Manual of equine reproduction.* 2^a ed. Estados Unidos, Mosby. pp. 143 – 164.

BLANCHARD, T.; VARNER, D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.; BRINSKO, S. y RIGBY, S. 2003b. Semen collection and artificial insemination. *In: Manual of equine reproduction.* 2^a ed. Estados Unidos, Mosby. pp. 131 – 142.

BOZKURT, T.; TÜRK, G. y GÜR, S. 2007. The time – dependent motility and longevity of stallion spermatozoa diluted in different spermatozoal concentrations and extenders during cool – storage. *Revue Méd. Vét.* 2007: 67 – 72.

BRINSKO, S. 2006. Insemination doses: how low can we go? *Theriogenology* 66: 543 – 550.

BRUEMMERT, J.; COY, R.; SQUIRES, E. y GRAHAM, J. 2002. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *J. Anim. Sci.* 80: 12 – 18.

BURNAUGH, L.; BALL, B.; SABEUR, K.; THOMAS, A. y MEYERS, S. 2010. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 249 – 260.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K. y BALL, B. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67: 580 – 589.

BUSTAMANTE FILHO, I.; PEDERZOLLI, C.; SGARAVATTI, A.; GREGORY, R.; DUTRA FILHO, C.; JOBIM, M. y MATTOS, R. 2009. Skim milk – egg yolk based semen extender compensates for non – enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim. Reprod.* 6: 392 – 399.

CARNEVALE, E. y COUTINHO DA SILVA, M. 2005. Técnicas de reproducción asistida. In: Reed, S.; Bayly, W. y Sellon, D. *Medicina interna equina*, vol. 2. 2ª ed. Argentina, Intermédica. pp. 1250 – 1256.

CARVER, D. y BALL, B. 2002. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 58: 1587 – 1595.

COUTINHO DA SILVA, M.; SEIDEL, G.; SQUIRES, E. y CARNEVALE, E. 2004. Casein, native phosphocaseinate and caseinoglycopeptide enhance binding of equine sperm to bovine zona pellucida. *Havemeyer foundation monograph series* 14: 58 – 60.

CRABO, B. 2001. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. *AAEP proceedings* 47: 291 – 295.

CROSS, N. 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7 – 11.

ENGLAND, G. 2005a. The normal stallion. *In: Fertility and obstetrics in the horse.* 3a ed. Inglaterra, Blackwell science. pp. 200 – 211.

ENGLAND, G. 2005b. Examination of the stallion for breeding soundness. *In: Fertility and obstetrics in the horse.* 3^a ed. Inglaterra, Blackwell science. pp. 212 – 225.

FOOTE, R. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *J. Anim. Sci.* 80: 1 – 10.

GADELLA, B. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 229 – 236.

GADELLA, B.; RATHI, R.; BEVERS, M.; BROUWERS, J.; NEILD, D. y COLENBRANDER, B. 2001a. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. *Havemeyer foundation monograph series* 5: 9 – 11.

GADELLA, B.; RATHI, R.; BROUWERS, J.; STOUT, T. y COLENBRANDER, B. 2001b. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249 – 265.

GORDON, I. 2004. Factors affecting male fertility. In: Reproductive technologies in farm animals. 1^a ed. Inglaterra, CABI publishing. pp. 28 – 33.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J. y AURICH, C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 63: 1354 – 1365.

KARESKOSKI, M. y KATILA, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 249 – 256.

KARESKOSKI, M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M. y KATILA, T. 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 33 – 38.

KATILA, T.; KARLSSON, M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KAIKKONEN, R. y KOSKINEN, E. 2001. Motility and viability of fractionated stallion ejaculates after 24 h of cooled storage. *Havemeyer foundation monograph series* 5: 3 – 5.

KATILA, T.; REILAS, T.; GÜVENC, K.; ALM, K. y ANDERSSON, M. 2003. The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. *Havemeyer foundation monograph series* 13: 3 – 5.

LOOMIS, P. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. Equine* 22: 663 – 676.

LOVE, V. 2007. Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness. *In*: Younhquist, R. y Threlfall, W. Current therapy in large animal theriogenology. 2a ed. Estados Unidos, Saunders. pp. 10 – 14.

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

MARENGO, S. 2008. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. Anim. Reprod. Sci. 105: 52 – 63.

MCNIVEN, M. y RICHARDSON, G. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. Cell Preservation Technol. 4: 169 – 177.

MEIRELLES, L.; MALSCHITSKY, E.; PIRES, A.; JOCHIMS, M.; KELLER, A.; KARDEL, A.; ANTONIAZZI DE MORAES, I.; GARBADE, P.; MACEDO, R. y COSTA, R. 1998. The use of not inactivated nonfat dry milk and UHT skim milk in the preservation and fertility of cooled equine semen. Ciencia rural 28: 467 – 470.

MÉNARD, M.; NAUC, V.; LAZURE, C.; VAILLANCOURT, D. y MANJUNATH, P. 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid – binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. Mol. Reprod. Dev. 66: 349 – 357.

MORRIS, L. 2004. Low dose insemination in the mare: an update. Anim. Reprod. Sci. 82: 625 – 632.

MUIÑO – BLANCO, T.; PÉREZ – PÉ, R. y CEBRIÁN – PÉREZ, J. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod. Dom. Anim. 43: 18 – 31.

NEILD, D.; GADELLA, B.; AGÜERO, A.; STOUT, T. y COLENBRANDER, B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 47 – 56.

NUNEZ, D.; ZORZATTO, J.; COSTA E SILVA, E. y ZÚCCARI, C. 2008. Efficiency of short – term storage of equine semen in a simple – design cooling system. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 434 – 439.

PADILLA, A. y FOOTE, R. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility pattern of slow – cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 69: 3308 – 3313.

PAGL, R.; AURICH, J.; MÜLLER – SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M. y AURICH, C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk – based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology* 66: 1115 – 1122.

POMMER, A.; LINFOR, J. y MEYERS, S. 2002. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology* 57: 1493 – 1501.

PRICE, S.; AURICH, J.; DAVIES – MOREL, M. y AURICH, C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15°C. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 261 – 266.

RICKER, J.; LINFOR, J.; DELFINO, W.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.; TABLIN, F.; CROWE, J.; BALL, B. y MEYERS, S. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid – based cryoprotectants. *Biol. Reprod.* 74: 359 – 365.

RIGBY, S.; BRINSKO, S.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T.; LOVE, C. y VARNER, D. 2001. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 171 – 180.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D. y CAMILLO, F. 2004. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 39: 103 – 109.

SAMPER, J. 2005. El semental. *In:* Reed, S.; Bayly, W. y Sellon, D. *Medicina interna equina*, vol. 2. 2ª ed. Argentina, Intermédica. pp. 1256 – 1292.

SAMPER, J. 2007. Techniques for artificial insemination. *In:* Youngquist, R. y Threlfall, W. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2a ed. Estados Unidos, Saunders. pp. 37 – 42.

SHEERIN, P. 2007. Different methods of semen collection. *In:* Proceedings of the North American veterinary conference: 13 al 26 de enero de 2007. Orlando, Estados Unidos. pp. 183 – 184.

SIEME, H.; ECHTE, A. y KLUG, E. 2002. Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology* 58: 313 – 316.

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.

SPIZZIRI, B.; FOX, M.; BRUEMMER, J.; SQUIRES, E. y GRAHAM, J. 2010. Cholesterol – loaded – cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 255 – 264.

THARASANIT, T.; MANEE – IN, S.; KHAMENKHETWIT, P.; SIRIVAIYAPONG, S. y LOHACHIT, C. 2007. The effect of cold storage on the quality of stallion semen and pregnancy rate after artificial insemination. *T. J. V. M.* 37: 39 – 48.

THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S. y MANJUNATH, P. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high – density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57: 1080 – 1088.

TÖPFER – PETERSEN, E.; EKHLASI – HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T. y SIEME, H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 159 – 170.

TORRES, P.; SERRES, C.; GÓMEZ – CUÉTARA, C.; SANTIAGO, I.; MATEOS, E. y ÁLVAREZ, A. 2006. Effect of cholesterol – loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 148 – 151.

TROEDSSON, M.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.; DAHMS, B.; DOW, C.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.; MACPHERSON, M.; POZOR, M. y BUHI, W. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 171 – 186.

VANDERWALL, D. 2008. How to process a dilute ejaculate of semen for cooled – transported insemination. *AAEP proceedings* 54: 369 – 373.

VARNER, D. 2003. Technical considerations for cooltransported equine semen. *In: Proceedings of the annual meeting of the Italian association of equine veterinarians: 1 y 2 de Febrero de 2003. Pisa, Italia. pp. s. p.*

VARNER, D. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70: 448 – 462.

VARNER, D. y JOHNSON, L. 2007. From a sperm's eye view – Revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP proceedings* 53: 104 – 177.

ANEXO

TABLA 8: motilidad espermática total.

	Potro 1				Potro 2				Potro 3				Potro 4				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	
Leche 1	Eyaculado 1	80	70	50	25	60	40	10	0	80	60	20	10	80	70	60	30
	Eyaculado 2	85	60	50	30	60	30	10	0	75	60	30	15	90	50	30	10
	Eyaculado 3	80	60	45	25	70	50	20	0	75	50	20	0	80	50	35	15
	Eyaculado 4	85	50	30	20	70	40	25	5	80	40	35	20	80	50	30	15
Leche 2	Eyaculado 1	80	40	30	10	60	20	0	0	80	50	10	0	80	60	50	30
	Eyaculado 2	85	65	30	0	60	20	0	0	75	50	20	10	90	25	15	10
	Eyaculado 3	80	60	30	10	70	40	10	0	75	20	10	0	80	40	20	0
	Eyaculado 4	85	30	20	0	70	15	10	0	80	20	20	10	80	50	30	15
Leche 3	Eyaculado 1	80	70	60	20	60	40	10	0	80	60	25	15	80	70	60	30
	Eyaculado 2	85	70	40	30	60	30	10	0	75	60	45	20	90	50	30	20
	Eyaculado 3	80	70	50	30	70	55	15	0	75	50	20	0	80	50	35	20
	Eyaculado 4	85	50	40	30	70	40	15	5	80	45	40	15	80	50	40	20
Leche 4	Eyaculado 1	80	60	40	20	60	15	0	0	80	40	25	0	80	70	40	40
	Eyaculado 2	85	60	40	20	60	10	0	0	75	40	25	0	90	30	20	10
	Eyaculado 3	80	50	40	10	70	35	15	0	75	30	20	0	80	60	20	5
	Eyaculado 4	85	40	35	15	70	20	10	0	80	30	20	10	80	50	15	0

L1, L2, L3 y L4: leche marca 1, marca 2, marca 3 y marca 4 respectivamente.

T₀, T₁, T₂, T₃: tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 respectivamente.

TABLA 9: motilidad espermática progresiva

	Poto 1				Poto 2				Poto 3				Poto 4				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	
Leche 1	Eyaculado 1	55	50	25	5	30	20	0	0	65	50	5	0	65	50	40	10
	Eyaculado 2	65	40	30	10	50	10	0	0	60	50	10	5	70	40	10	0
	Eyaculado 3	65	40	20	10	40	40	10	0	50	40	0	0	70	30	15	5
	Eyaculado 4	70	40	20	10	50	20	10	0	60	20	20	0	70	25	15	0
Leche 2	Eyaculado 1	55	30	10	0	30	5	0	0	65	30	0	0	65	40	30	10
	Eyaculado 2	65	50	10	0	50	0	0	0	60	30	5	0	70	10	0	0
	Eyaculado 3	65	40	10	0	40	25	0	0	50	10	0	0	70	15	0	0
	Eyaculado 4	70	10	10	0	50	0	0	0	60	10	5	0	70	10	5	0
Leche 3	Eyaculado 1	55	60	35	10	30	20	0	0	65	40	10	10	65	50	50	10
	Eyaculado 2	65	60	30	15	50	10	0	0	60	40	25	10	70	30	15	0
	Eyaculado 3	65	50	30	20	40	45	5	0	50	40	10	0	70	30	15	10
	Eyaculado 4	70	40	30	10	50	20	5	0	60	30	25	0	70	30	20	10
Leche 4	Eyaculado 1	55	50	20	5	30	0	0	0	65	20	10	0	65	40	30	10
	Eyaculado 2	65	40	20	10	50	0	0	0	60	20	0	0	70	10	10	0
	Eyaculado 3	65	30	20	0	40	15	0	0	50	20	0	0	70	40	10	0
	Eyaculado 4	70	30	20	0	50	10	0	0	60	15	10	0	70	40	0	0

L1, L2, L3 y L4: leche marca 1, marca 2, marca 3 y marca 4 respectivamente.

T₀, T₁, T₂, T₃: tiempo 0, tiempo 1, tiempo 2 y tiempo 3 respectivamente.

TABLA 10: interacción entre tiempo y leche para la característica de motilidad total.

Tiempo	Leche	n	Medias MT
0	1	16	76.88 a
0	2	16	76.88 a
0	3	16	76.88 a
0	4	16	76.88 a
1	1	16	51.88 b
1	2	16	37.81 c
1	3	16	53.75 b
1	4	16	40 c
2	1	16	31.25 cd
2	2	16	19.06 e
2	3	16	33.44 c
2	4	16	22.81 de
3	1	16	13.75 ef
3	2	16	5.94 f
3	3	16	15.94 ef
3	4	16	8.13 f

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TABLA 11: Interacción entre tiempo y leche para la característica de motilidad progresiva.

Tiempo	Leche	N	Medias MP
0	1	16	58.44 a
0	2	16	58.44 a
0	3	16	58.44 a
0	4	16	58.44 a
1	1	16	35.31 b
1	2	16	16.69 c
1	3	16	35.94 b
1	4	16	23.75 c
2	1	16	14.38 cd
2	2	16	5.31d de
2	3	16	19.06 c
2	4	16	9.38 de
3	1	16	3.44 e
3	2	16	0.63 e
3	3	16	6.56 de
3	4	16	1.56 e

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TABLA 12: interacción entre tiempo y potro para la característica de motilidad progresiva.

Tiempo	Potro	n	Medias MP
0	1	16	63.75 ab
0	2	16	42.50 c
0	3	16	58.75 b
0	4	16	68.75 a
1	1	16	40.63 c
1	2	16	14.38 efg
1	3	16	29.06 d
1	4	16	30.63 d
2	1	16	21.25 de
2	2	16	1.88 h
2	3	16	8.44 fgh
2	4	16	16.56 ef
3	1	16	6.56 gh
3	2	16	0 h
3	3	16	1.56 h
3	4	16	4.06 h

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).