

TÉCNICAS EMPLEADAS PARA AUMENTAR LA CALIDAD SEMINAL EN CABALLOS



ÁNGELA MUÑOZ JUÁREZ NP:111685
MARTA PALOMAR CASAS NP:107509

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1. SEPARACIÓN DEL PLASMA SEMINAL	6
2. COLCHONES DE CENTRIFUGACIÓN	7
3. CENTRIFUGACIÓN EN UNA SOLA CAPA	8
4. CENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTES DE DENSIDAD.....	9
5. BIBLIOGRAFÍA	14

1. INTRODUCCIÓN

La leyenda cuenta que en 1322 un jefe árabe deseaba conseguir el semen del caballo rival, por lo que mando a un espía el cual recogió el semen de la vagina de una yegua que acababa de ser inseminada, lo diluyo con leche de camello y lo guardo en una bolsa de piel de cabra, luego este fue introducido en una yegua y al año siguiente nació un potro y así fue como se realizó la primera inseminación artificial.

Con la inseminación artificial se han conseguido numerosas ventajas ya que se aprovecha al máximo el potencial genético de aquellos sementales de alta calidad, se mejora el control sanitario disminuyendo la transmisión de enfermedades, disminuye las posibilidades de producirse daños tanto en el semental como en la yegua, permite la extracción de semen en aquellos caballos que tengan lesiones que le impidan realizar la monta, mejora el resultado de la fertilidad y facilita la implantación de programas de sincronización y cruzamientos.

La inseminación artificial también cuenta con algunas desventajas como son el completo conocimiento de la técnica, detectar el momento óptimo para realizar la inseminación y el coste del equipo.

Algunos de los problemas de la inseminación artificial son: que en los caballos de Pura Sangre Inglés no está permitido el uso de la inseminación artificial, esta prohibición está basada en el posible mal uso de esta técnica como por el abuso de la misma, además presenta otro problema es que los porcentajes de concepción que se alcanzan cuando se utiliza semen congelado en yaguas son más bajos que cuando se utilizan en el ganado bovino.

Para poder llevar a cabo la inseminación artificial, es necesaria la recolección de semen de un semental equino. Existe diferentes métodos para recolectar el semen; mediante el empleo de un condón o de una vagina artificial. Esta última proporciona mejores resultados y permite obtener muestras menos contaminadas.

Tras la recolección del semen, es necesario evaluar el mismo con el objetivo de evitar la contaminación y mantener un grado alto de pureza y fecundidad. Para verificar que el semen es de buena calidad se valoran los siguientes parámetros (1):

CARACTERÍSTICAS	RANGO	PROMEDIO
VOLUMEN TOTAL (ml.)	30-200	70
PROPORCIÓN LIBRE DE GEL	40-75	58
GEL	0-200	27
CONCENTRACIONES (MILLONES/ml)	30-800	120
PORCIÓN LIBRE DE GEL	220-320	282
NÚMERO TOTAL (BILLONES)	4-20	8.4
MOTILIDAD PROGRESIVA (%)	60-95	78
MORFOLOGÍA NORMAL (%)	65-95	75
pH	6.8-7.8	7.4

Imagen 1.-Rango de valores de las características seminales

Una vez recolectado y examinado el semen, se procede a su conservación. Actualmente no se cuenta con una técnica adecuada para diluir y almacenar el semen equino. Si se reduce de 2°C hasta 4°C la temperatura del esperma, evitando que entre en contacto con el oxígeno, los espermatozoides pueden

conservar su capacidad fecundante hasta 24-48 horas tras la recogida del eyaculado. La temperatura óptima de conservación es entre 5-15°C. No obstante, el semen también puede conservarse a temperaturas de congelación nitrógeno líquido (-170°C) siendo la viabilidad infinita mientras no se pierda la cadena de frío.

Para la conservación del semen, es necesario emplear diluyentes con base acuosa cuya osmolaridad se modifica agregando glucosa, leche condensada con 60% de agua, yema de huevo, gelatina, fosfato, lactosa, glicerol o antibiótico. En cuanto al gradiente de dilución; un tercio para la conservación y un décimo cuando vaya a ser usado de forma inmediata.

Si el semen va a ser congelado para su posterior uso, es necesario el uso de glicerol, para proteger el esperma de la formación de cristales y el uso de antibióticos, para controlar el crecimiento bacteriano.

En si el objetivo de las técnicas empleadas para el procesamiento del semen es conseguir una cantidad de semen de buena calidad, eliminando aquellos espermatozoides que no sean válidos, prolongar la supervivencia y la protección de los espermatozoides. Al realizar la selección de los espermatozoides válidos se consiguen muestras de mejor calidad aumentando las posibilidades de éxito (1).

Las técnicas empleadas con el fin de aumentar la calidad del semen son:

- **Separación del plasma seminal.**
- **Colchones de centrifugación.**
- **Técnicas de selección de espermatozoides:** se obtienen un menor número de espermatozoides que los presentes en la muestra inicial, pero con mejores características.

Algunas de estas técnicas son:

- **La migración espermática:** se obtienen espermatozoides con mayor motilidad.
- **Filtración:** mejora la integridad de la membrana.
- **Centrifugación coloidal:** se obtienen espermatozoides de mayor calidad, morfológicamente normales y con una membrana íntegra. Los tipos de centrifugación son en una única capa y gradientes de densidad (EquiPure) (2).

1. SEPARACIÓN DEL PLASMA SEMINAL

La primera técnica que se utiliza es la dilución desde 1-1 o 1-5 (1 de semen y 5 de diluyente) para rebajar la cantidad de plasma.

Con la realización de inseminación artificial, con la extracción del semen y evaluación del mismo se consiguen aumentar las tasas de fertilidad, para ello hay que eliminar los espermatozoides no viables, los restos celulares y el plasma seminal antes de su uso o para su conservación ya que su presencia reduce la calidad y la viabilidad del semen.

Para la eliminación del plasma seminal se utiliza un filtrado del espermatozoides siendo un método eficiente y práctico.

Esta técnica tiene una menor pérdida de espermatozoides que con la centrifugación.

Se ha estudiado que la presencia del plasma seminal en el semen refrigerado reduce la calidad y la viabilidad del mismo ya que el semen se vuelve más sensible al proceso de refrigeración.

La eliminación del plasma seminal es necesario para la congelación del semen, generalmente se utiliza la centrifugación del semen, pero esto causa daño mecánico a los espermatozoides, por lo que se han ido desarrollando

nuevos métodos de separación del plasma seminal con la utilización de un filtro compuesto por una membrana hidrofílica sintética que retiene las células espermáticas y permite el paso del plasma seminal, con la cual se consigue una menor pérdida de espermatozoides que con la técnica de centrifugación.

Con la filtración del plasma seminal, además de reducir el daño en la membrana plasmática reduce el crecimiento bacteriano en el semen y es un método más práctico que la centrifugación debido a que se puede utilizar a pie de campo puesto que no necesita maquinaria de laboratorio de centrifugación (3).

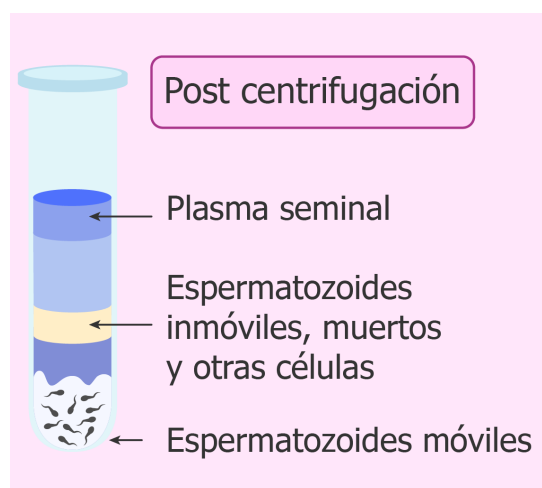


Imagen 2

2. COLCHONES DE CENTRIFUGACIÓN

La centrifugación del semen se utiliza para concentrar eyaculados diluidos y para eliminar el exceso de plasma seminal.

Un aumento en el tiempo de centrifugación da como resultado una mayor tasa de recuperación de espermatozoides, pero también puede conducir a la disminución de la motilidad o la calidad de los mismos debido a las fuerzas

mecánicas asociadas con la centrifugación y la concentración excesiva del esperma.

Esta técnica se considera una alternativa a la técnica de separación del plasma seminal.

Se emplean coloides de alto peso molecular como el idioxanol, el cual se trata de un compuesto yodado no iónico. Estos protegen al espermatozoide de las fuerzas elevadas de centrifugación asegurando así una recolección máxima de esperma minimizando los daños. Con la utilización de este tipo de centrifugación se consigue un esperma de alta calidad manteniendo la función espermática.

Los tres productos que se utilizan son:

- Otiprep™.
- Cushion Fluid™.
- Maxifreeze™.

La función de estos productos son amortiguar a los espermatozoides durante la centrifugación, con el objetivo de conseguir una concentración determinada de espermatozoides, ya sea para la preparación de una dosis en un procedimiento de una inseminación profunda, antes de la congelación del semen, previo al almacenamiento del semen en refrigerado o para facilitar la eliminación de contaminación urinaria del semen (4).

3. CENTRIFUGACIÓN EN UNA SOLA CAPA

Emplea coloides de menor peso molecular que los colchones de centrifugación. Su objetivo es seleccionar los espermatozoides de mayor motilidad, de morfología normal, con membranas plasmáticas intactas y

cromatina íntegra. Este método se basa en el tamaño y densidad de los espermatozoides con el fin de seleccionar los maduros.

Muestra el rendimiento del esperma y lo relaciona con la fertilidad del eyaculado, siendo un indicador alternativo de la fertilidad del semental. Es una prueba rápida y no requiere un equipo costoso.

El rendimiento de espermatozoides progresivamente móviles después de la centrifugación se encontró correlacionado con la tasa de gestación. El daño de la cromatina se encuentra correlacionado negativamente con la tasa de gestación. Esta última se relacionó también con la integridad de la membrana, la motilidad progresiva y la morfología normal.

Se han realizado estudios donde se utiliza un coloide específico llamado Androcoll-B, seleccionando una subpoblación del esperma móvil y con las membranas intactas. Con la utilización de este producto se consigue seleccionar espermatozoides con un mayor potencial de membranas mitocondriales y una menor producción de especies reactivas de oxígeno.

Además, también se puede utilizar otro producto llamado Androcoll-E el cual se utiliza para la selección del espermatozoide antes de la crioconservación, aumentando así la calidad del esperma cuando se descongela. Sin embargo, con esta técnica se consiguen un menor volumen de pajuelas haciendo este método limitado en los sementales cuyo semen se puede congelar puesto que están dando buenos resultados con los protocolos de congelación estándares. (5)

4. CENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTES DE DENSIDAD

Existe una técnica muy demandada en el mercado basada en la centrifugación del semen por gradientes de densidad con el objetivo de eliminar agentes patógenos del semen y especies reactivas de oxígeno causantes de la degradación del semen. Esta técnica se conoce con el nombre de EquiPure. Algunos inconvenientes de esta técnica son que su preparación es lenta y complicada y además los componentes empleados para hacer la mezcla son costosos encareciendo el proceso. Esta técnica emplea coloides que no penetran en la membrana de las células, no osmóticamente estresantes. Están formulados para crear una gravedad específica que separa las células densas. Su baja viscosidad evita que existan interferencias en la sedimentación de los espermatozoides.

El uso del sistema EquiPure permite obtener semen de mayor calidad.

El sistema está desarrollado para la centrifugación de pequeños volúmenes de semen.

Para abaratar los costos del proceso se puede recurrir a protocolos en los que se utiliza un solo gradiente.

La centrifugación mediante gradientes es también efectiva para eliminar agentes patógenos del semen.(6)

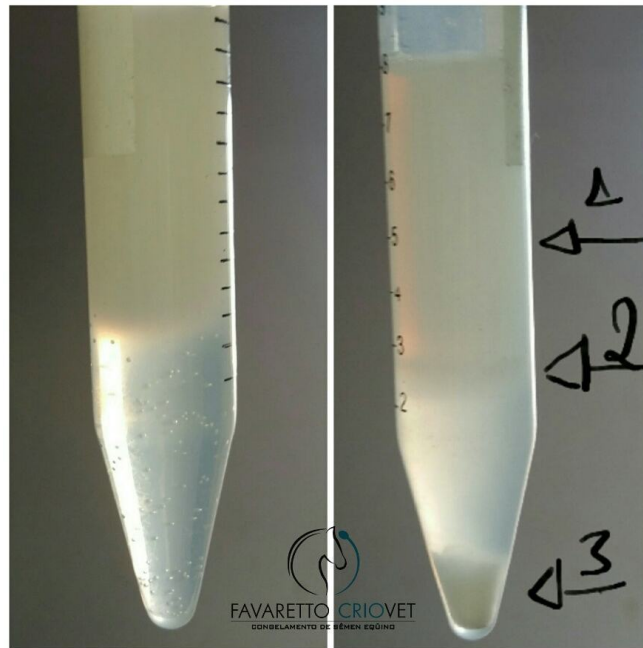


Imagen 3

1. Sobrenadante.
2. Células espermáticas lisadas.
3. Células espermáticas seleccionadas.

Un ejemplo de un protocolo de purificación del semen basada en la separación de espermatozoides mediante gradientes de densidad, realizado por la Universidad Complutense de Madrid, sería el siguiente:

1. Refrigeración del semen y centrifugado para retirar el plasma seminal.
2. Se emplean dos coloides de diferente densidad: Bottom Layer (densidad del 80%) y Top Layer (densidad del 40%). Estos coloides se añaden previamente en un tubo de refrigeración procurando que no se mezclen a fin de evitar la formación de una fase intermedia que inutilizaría el gradiente.
3. Se añade la muestra de semen previamente centrifugada.
4. Los espermatozoides se separan en función de sus puntos isopícnicos, es decir, se sitúan en el gradiente donde haya menor densidad. Los

espermatozoides con morfoanomalías o con menor motilidad se van a capas superiores, mientras que los morfológicamente normales y los de mejor motilidad se van a capas inferiores. Estos últimos, se desplazan fácilmente por el coloide formando un pellet en el fondo.

5. El pellet es aspirado con una pipeta Pasteur.
6. El pellet se resuspende y se diluye hasta obtener una concentración de espermatozoides con motilidad progresiva/ml.
7. Se centrifuga la solución y mediante un sistema computerizado (Proyser) se observa si ha habido una mejora en la motilidad progresiva (2)

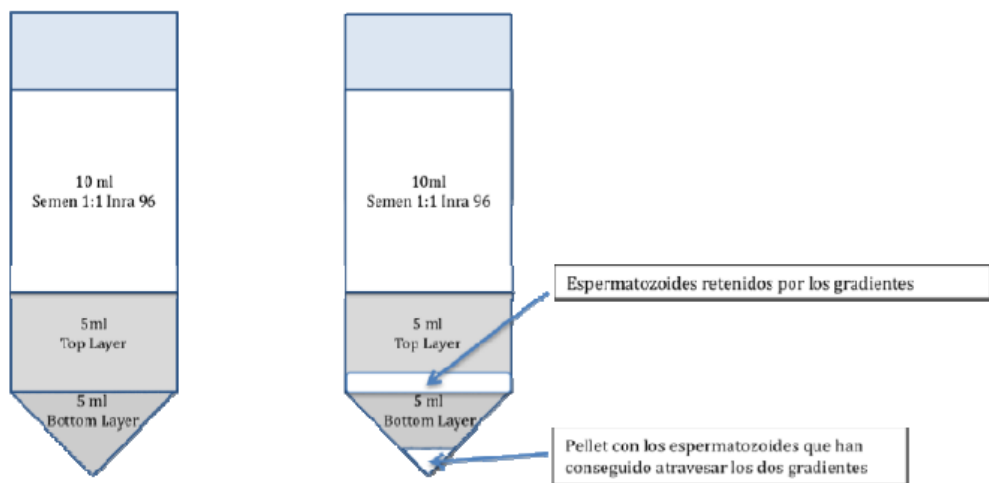


Imagen 4

Volumen eyaculado	Tamaño del tubo (ml)	Volumen Bottom layer (ml)	Volumen Top layer (ml)	Volumen de semen por tubo (ml)
Pequeño	10-15	2	2	2-3
Mediano	50-60	5	5	4-6
Grande	50-60	10	10	7-10

Imagen 5.-Cantidades de coloides a emplear según el volumen de semen

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Animal DDEC. Universidad autónoma agraria "antonio narro" división de ciencia animal.
2. Complutense R, Veterinarias C. Issn: 1988-2688. 2011;5(2):36-48.
3. Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA, Papa FO, et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. 2013;79(7):1120-3.
4. Len JA, Beehan DP, Lyle SK, Eilts BE. Cushioned versus noncushioned centrifugation: Sperm recovery rate and integrity. *Theriogenology*. 2013;80(6):648-53.
5. Santos FCCD, Morrell JM, Curcio BDR, Nunes MM, Malschitzky E. Cushioned and Single Layer Centrifugation Improve Epididymal Stallion Sperm Motility Postcentrifugation. *J Equine Vet Sci*. 2017;57:56-60.
6. Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR, Varner DD. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology*. 2012;77(5):959-66.