

# Características seminales antes y después de la criopreservación de seis razas de equinos en latitudes cercanas al Ecuador



<https://cu-id.com/2248/v44e12>

## Semen characteristics before and after cryopreservation of six horse breeds at latitudes near the Equator

✉ Antonio Jersain Montiel Quiroga<sup>1</sup>, ✉ José Ernesto Hernández Pichardo<sup>2</sup>, ✉ Arianna Miranda Martínez<sup>2</sup>,  
✉ Jaqueline Posadas Rodríguez<sup>1</sup>, ✉ José Luis Rodríguez Suástegui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Clínica privada, Centro de Reproducción y Medicina Equina. Abel Quezada 14, Colonia Ampliación Miguel Hidalgo, CP 14250, Tlalpan, CDMX, México.

<sup>2</sup>Laboratorio Manejo de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, CP 04960, Coyoacán, CDMX, México.

**RESUMEN:** El objetivo de la presente investigación fue analizar la calidad del semen antes y después de la congelación, de seis razas de equinos durante la época reproductiva y no reproductiva, en latitudes cercanas al Ecuador. Se analizaron 302 eyaculados de seis razas de equinos, en los cuales se determinaron el volumen, motilidad progresiva, concentración espermática, millones de espermatozoides motiles, y dosis aprobadas para la inseminación artificial (IA). Considerando latitudes cercanas al Ecuador, la motilidad progresiva, concentración espermática, millones de espermatozoides motiles en las seis razas, fueron similares entre la época reproductiva y no reproductiva ( $p > 0,05$ ), excepto el volumen donde la raza Holsteiner varió entre las épocas ( $p < 0,05$ ). Las comparaciones dentro de las razas, la Holsteiner sobresalió en algunos parámetros durante la etapa reproductiva ( $p < 0,05$ ). Aumentó el número de dosis aprobadas para IA durante la época reproductiva ( $p < 0,05$ ), independientemente del tipo de crioprotector o envase utilizado para congelar. No se observó un cambio significativo en los parámetros evaluados antes de la congelación en la mayoría de las razas evaluadas, en latitud cercana al Ecuador, sin embargo, sí se determinó un cambio en las dosis aprobadas para la IA durante la época reproductiva.

**Palabras clave:** Calidad seminal, crioconservación del semen, crioprotector, razas de equino, Ecuador.

**ABSTRACT:** This research was aimed at analyzing semen quality before and after freezing, of six horse breeds during the reproductive and non-reproductive season, at latitudes near the Equator. Three hundred and two ejaculates from six horse breeds were analyzed, in which volume, progressive motility, sperm concentration, millions of motile spermatozoa, and approved doses for artificial insemination (AI), were determined. Considering latitudes near the Equator, progressive motility, sperm concentration and millions of motile spermatozoa in the six breeds were similar between breeding and non-breeding seasons ( $p > 0.05$ ); except for volume, where Holsteiner breed varied between seasons ( $p < 0.05$ ). Regarding comparisons among breeds, Holsteiner showed an outstanding behavior in some parameters during the breeding season ( $p < 0.05$ ). The number of doses approved for AI during breeding season increased ( $p < 0.05$ ), regardless of the type of cryoprotectant or the package used for freezing. No significant change was observed in the parameters assessed before freezing in most breeds, at latitudes near the Equator. However, a change in the number of the approved doses for AI during breeding season was observed.

**Key words:** Semen quality, semen cryopreservation, cryoprotectant, horse breeds, Equator.

## INTRODUCCIÓN

La industria de la cría equina ha aumentado en los últimos 30 años en diferentes países del mundo, mediante el uso de tecnologías de reproducción asistida (TRA) como la inseminación artificial (IA), la transferencia de embriones (TE) y más recientemente la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) (1). La IA con semen congelado es la TRA que más se aplica actualmente en los equinos, debido a las siguientes ventajas: acceso a semen de caballos que se encuentre en otros países, disponibilidad continua de semen, disminución del riesgo de transmisión de enfermedades venéreas y conservación de material genético por tiempo indefinido, además facilita y reduce el costo ya que solo se transporta el semen y no al semental (2, 3, 4).

Dentro de las especies domésticas que poseen una fuerte estacionalidad en los procesos reproductivos se encuentra el equino (5), donde la época reproductiva se manifiesta en los días largos, o sea primavera y verano (6,7). Durante este periodo mejoran las características seminales y aumenta el volumen del eyaculado, la concentración espermática y la motilidad (5), así como el tamaño y peso testicular (7). Estudios realizados en el hemisferio norte han demostrado que las características seminales de la raza Cuarto de Milla y Warmblood son diferentes, según la época del año, ya que en la primavera se observa una mayor producción de espermatozoides por día, mientras que la concentración espermática y la motilidad progresiva es menor durante el invierno (7).

\*Correspondencia a: José Luis Rodríguez Suástegui. E-mail: [embrioninvitro@hotmail.com](mailto:embrioninvitro@hotmail.com)

Recibido: 12/09/2022

Aceptado: 01/12/2022

Se ha determinado que el control que ejerce el fotoperiodo en la estacionalidad reproductiva es más evidente en las latitudes altas, ya sea en el norte o al sur del ecuador (mayores a 30°) (5), esta estacionalidad no se hace tan evidente en la zona ecuatorial, debido a que existe una similitud en la duración del día y la noche, sin variaciones durante todo el año (8). Sin embargo, en latitudes cercanas al ecuador (entre la latitud 15° y 22°) se observa una etapa anovulatoria en yeguas, a pesar de la diferencia de tan solo dos horas entre la duración del día más largo y el día más corto (5).

Existen pocas investigaciones que evalúen la calidad seminal de eyaculado de equino en latitudes cercanas al ecuador, por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la calidad del semen antes y después de la congelación de seis razas de equinos durante la época reproductiva y no reproductiva en latitudes cercanas al ecuador.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo de la criopreservación de eyaculados obtenidos de 2006 a 2021 en una empresa particular dedicada a la reproducción equina. Se evaluaron 302 eyaculados de seis razas de equinos: Cuarto de Milla, Árabe, Frisón, Español, Warmblood y Holsteiner. Los sementales se ubicaron entre la Ciudad de México (CDMX) (entre 19° latitud Norte) (9) y la ciudad de Pachuca, Estado de Hidalgo (20° latitud Norte) (10).

Los sementales evaluados se consideran de alto valor (edad 5-10 años), por lo que se encontraban en un adecuado alojamiento, alimentación y salud. El manejo del semen se realizó bajo estricta vigilancia de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1995 (11).

### Obtención y evaluación del semen

El semen se obtuvo con la ayuda de una vagina artificial modelo Colorado. Al momento de la colección, la fracción del gel se removió por medio de un filtro adaptado al recipiente de colección estéril (6). El volumen del eyaculado se midió con una probeta graduada (12). La motilidad progresiva de los espermatozoides se determinó colocando una gota de semen sobre un portaobjeto en una platina térmica a 37 °C (13). La concentración espermática se determinó mediante conteo directo en una cámara de Neubauer (concentración por mL) (12). Una vez obtenido los valores de volumen, motilidad progresiva y concentración de espermatozoides por mL, se determinó la motilidad progresiva y la concentración espermática por eyaculado.

### Congelación del semen

Una vez realizada la evaluación, el semen se diluyó con el diluyente Kenny modificado, en una proporción de 1:1 por cada 200 millones, se centrifugó a 600 g por 15 minutos para obtener solo los espermatozoides, se resuspendieron con un diluyente de congelación con 3,5% de Glicerol o Amida (N,N-Dimethylformamida), respectivamente. Posteriormente el semen ya diluido, fue envasado en pajillas (0,5 mL) o macrotubos (5 mL), los cuales se sometieron a una curva de enfriamiento a 4 °C por 20 minutos y después se colocaron en vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las pajillas o macrotubos se sumergieron en nitrógeno líquido.

### Descongelación del semen

Una pajilla y macrotubo se tomaron aleatoriamente de cada eyaculado, se descongelaron a 37 °C por 60 seg y 50 °C por 45 seg, respectivamente. Para determinar la motilidad progresiva post descongelado, se consideró que el semen descongelado aprobado para la IA en equinos debe presentar  $\geq 30\%$  de motilidad progresiva.

### Diseño Experimental

Se obtuvieron eyaculados de diferentes razas (Cuarto de Milla, Frisón, Español, Warmblood y Holsteiner) en la CDMX y (Árabe) en el Estado de Hidalgo durante la época reproductiva y no reproductiva, respectivamente. Para la evaluación del semen se consideró determinar el volumen, motilidad progresiva, millones de espermatozoides por mL, millones de espermatozoides por eyaculado y millones de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado. Para la congelación de los espermatozoides se utilizaron dos crioprotectores (Glicerol y Amida) y dos recipientes (pajilla y macrotubo). En la evaluación de los espermatozoides post descongelación se consideró a las pajillas y macrotubos aprobados aquellos con motilidad progresiva  $\geq 30\%$  (1). Todas las evaluaciones se realizaron por una sola persona.

### Análisis estadístico

Los datos de volumen, número de espermatozoides por mL, número de espermatozoides por eyaculado, número de espermatozoides con motilidad progresiva se sometieron a un análisis de varianza. La comparación entre los grupos se realizó la prueba múltiple de Tukey-Kramer. Los porcentajes de motilidad progresiva y aprobados se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado  $\chi^2$ . En ambas pruebas se consideró un valor de significación de 0,05 (14).

## RESULTADOS

El volumen de los eyaculados obtenidos en las diferentes razas, no se observó diferencia significativa ( $p>0,05$ ), durante la época reproductiva y no reproductiva a excepción de la raza Holsteiner. La raza Frisón produjo un mayor volumen de eyaculado, tanto en la época reproductiva como no reproductiva (Tabla 1), y mostró diferencia ( $p<0,05$ ) con la raza Cuarto de Milla en la época reproductiva, con menor volumen de eyaculado en este estudio.

No se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ), en los porcentajes de motilidad progresiva obtenidos, entre la época reproductiva y no reproductiva (Tabla 2), así como entre las razas; fue la raza

Árabe la que presentó el máximo porcentaje de motilidad progresiva (77%).

En la concentración espermática por mL no se observó diferencia significativa ( $p>0,05$ ) entre las épocas reproductiva y no reproductiva (Tabla 3); pero sí la hubo entre la raza Holsteiner con la Árabe, Frisón y Español en la época reproductiva ( $p<0,05$ ).

Al estudiar la concentración espermática por eyaculado (Tabla 4), no se observó diferencia significativa ( $p>0,05$ ) entre la época reproductiva y no reproductiva. Sin embargo, en la concentración espermática entre razas, sí hubo diferencia significativa ( $p<0,05$ ), tanto en la época reproductiva como no reproductiva, siendo la raza Holsteiner con la mayor concentración (12613 millones de espermatozoides por eyaculado)

**Tabla 1.** Volumen (mL) de eyaculados de seis razas de equinos. / *Volume (mL) of ejaculates from six horse breeds.*

Época/Raza media±DE (n)	Cuarto de Milla	Árabe	Frisón	Español	Warmblood	Holsteiner
Reproductiva	54±21 <sup>a1</sup> (76)	77±24 <sup>ab1</sup> (7)	87±30 <sup>b1</sup> (19)	77±47 <sup>b1</sup> (31)	68±24 <sup>ab1</sup> (18)	56±18 <sup>ab1</sup> (14)
Min-Max	20-130	36-110	20-135	30-200	25-110	30-90
No Reproductiva	54±17 <sup>a1</sup> (89)	63±26 <sup>ab1</sup> (5)	93±6 <sup>ab1</sup> (3)	68±77 <sup>ab1</sup> (3)	90±36 <sup>b1</sup> (8)	89±41 <sup>b2</sup> (29)
Min-Max	15-100	27-95	90-100	60-75	50-150	20-160

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

**Tabla 2.** Motilidad progresiva de eyaculados de seis razas de equinos. / *Progressive motility of ejaculates from six horse breeds.*

Época/Raza media±DE (n)	Cuarto de Milla	Árabe	Frisón	Español	Warmblood	Holsteiner
Reproductiva	74±5 <sup>a1</sup> (76)	77±3 <sup>a1</sup> (7)	71±9 <sup>a1</sup> (19)	71±6 <sup>a1</sup> (31)	74±2 <sup>a1</sup> (18)	75±1 <sup>a1</sup> (14)
Min-Max	50-80	75-80	50-80	50-80	70-80	75-80
No Reproductiva	73±10 <sup>a1</sup> (89)	74±2 <sup>a1</sup> (5)	58±14 <sup>a1</sup> (3)	75±0 <sup>a1</sup> (3)	72±5 <sup>a1</sup> (8)	75±3 <sup>a1</sup> (29)
Min-Max	20-85	70-75	50-75	75-75	60-75	65-80

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

**Tabla 3.** Millones de espermatozoides por mL de eyaculados de seis razas de equinos. / *Millions of spermatozoa per mL of ejaculates from six horse breeds.*

Época/Raza media±DE (n)	Cuarto de Milla	Árabe	Frisón	Español	Warmblood	Holsteiner
Reproductiva	160±73 <sup>ab1</sup> (76)	96±45 <sup>a1</sup> (7)	137±78 <sup>a1</sup> (19)	139±98 <sup>a1</sup> (31)	184±69 <sup>ab1</sup> (18)	230±41 <sup>b1</sup> (14)
Min-Max	50-350	55-190	85-412	50-465	63-300	150-310
No Reproductiva	140±64 <sup>a1</sup> (89)	213±86 <sup>a1</sup> (5)	147±52 <sup>a1</sup> (3)	85±4 <sup>a1</sup> (3)	124±74 <sup>a1</sup> (8)	179±109 <sup>a1</sup> (29)
(Min-Max)	57-330	90-331	95-200	80-88	30-260	62-480

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p<0,05$ ).

**Tabla 4.** Millones de espermatozoides por eyaculados de seis razas de equinos. / Millions of spermatozoa per ejaculates from six horse breeds.

Época/Raza media±DE (n)	Cuarto de Milla	Árabe	Frisón	Español	Warmblood	Holsteiner
Reproductiva	7482±2460 <sup>a1</sup> (76)	6560±1183 <sup>ab1</sup> (7)	10197±2021 <sup>ab1</sup> (19)	8945±4742 <sup>ab1</sup> (31)	12219±6015 <sup>b1</sup> (18)	12613±4073 <sup>b1</sup> (14)
(Min-Max)	(2000-14950)	(4818-8250)	(7200-13905)	(2560-24180)	(5249-25850)	(6270-21600)
No Reproductiva	7192±3320 <sup>a1</sup> (89)	12315±4684 <sup>ab1</sup> (5)	13750±4796 <sup>ab1</sup> (3)	5807±713 <sup>ab1</sup> (3)	11825±8805 <sup>ab1</sup> (8)	12756±4902 <sup>b1</sup> (29)
(Min-Max)	(2280-19200)	(6075-16550)	(8550-18000)	(5220-6600)	(1500-28600)	(6648-24750)

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

durante la época reproductiva, mientras que la raza Frisón fue en la época no reproductiva (13750 millones de espermatozoides por eyaculado).

La cantidad de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado (Tabla 5) fue similar ( $p > 0,05$ ) entre las épocas reproductiva y no reproductiva; pero el comportamiento de la raza Holsteiner fue diferente al Cuarto de Milla, Árabe y Español durante la época reproductiva ( $p < 0,05$ ). Además, la raza Holsteiner mostró el máximo número de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado en la época reproductiva y no reproductiva.

El número de dosis por eyaculado en relación con el tipo de envase y crioprotector (Tabla 6) fue mayor en pajillas por eyaculado en comparación con los macrotubos (32-46 vs 14), con una concentración de 153-168 y 702-731 millones de espermatozoides en

pajilla y macrotubo, respectivamente. Está claro que durante la época reproductiva aumenta el número de eyaculados aprobados ( $p < 0,05$ ) independientemente del tipo del crioprotector o envase utilizado para congelar.

## DISCUSIÓN

El ciclo reproductivo de los caballos depende del aumento de las horas luz (fotoperiodo positivo) y una disminución en la secreción de la hormona melatonina permitiendo la liberación de la hormona liberadora de hormonas (GnRH) y a su vez las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). La LH influye en las células de Leydig, convirtiendo el colesterol en testosterona, la cual es importante para la espermatogénesis (15,16). Existen otros factores que influ-

**Tabla 5.** Millones de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculados de seis razas de equinos. / Millions of progressively motile spermatozoa per ejaculates from six horse breeds.

Época/Raza media±DE (n)	Cuarto de Milla	Árabe	Frisón	Español	Warmblood	Holsteiner
Reproductiva	5522±1749 <sup>a1</sup> (76)	5052±856 <sup>ab1</sup> (7)	7140±1510 <sup>abc1</sup> (19)	6382±3422 <sup>ab1</sup> (31)	8839±4194 <sup>bc1</sup> (18)	9498±3039 <sup>c1</sup> (14)
(Min-Max)	(1400-11440)	(3613-6187)	(5000-10896)	(1792-16926)	(3937-15937)	(4702-16200)
No Reproductiva	5257±2486 <sup>a1</sup> (89)	9082±3402 <sup>ab1</sup> (5)	7587±1310 <sup>ab1</sup> (3)	4355±535 <sup>ab1</sup> (3)	8302±5561 <sup>ab1</sup> (8)	9571±3693 <sup>b1</sup> (29)
(Min-Max)	(1404-14250)	(4556-12412)	(6412-9000)	(3915-4950)	(1050-17160)	(4986-18562)

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Dosis por eyaculado, concentración (pajilla o macrotubo), y eyaculados aprobados, con relación al crioprotector (amida, glicerol), y la época reproductiva o no reproductiva. / Dose per ejaculates, concentration (straw or macrotube), and approved ejaculates, in relation to the cryoprotectant (amide, glycerol), and the breeding or non-breeding season.

Época	Reproductiva			No Reproductiva				
	Pajillas 0,5 mL			Pajillas 0,5 mL				
Crioprot	N	Dosis X eyac	Conc X Pajilla	Aprobados % (n)	N	Dosis X eyac	Conc X Pajilla	Aprobados % (n)
Amidas	n=55	X= 38	X= 164	X= 67 <sup>a1</sup>	n=35	X=41	X=168	X= 48 <sup>b1</sup>
Glicerol	n=39	X= 46	X=156	X=75 <sup>a1</sup>	n=58	X=32	X= 153	X= 47 <sup>b1</sup>
		Macrotubos 5 mL				Macrotubos 5 mL		
Glicerol	n=88	X= 14	X= 731	X=67 <sup>a1</sup>	n= 47	X= 17	X= 702	X= 50 <sup>b1</sup>

Medias con letra diferente en una misma línea tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Medias con número diferente en una misma columna tienen diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Aprobados=  $\geq 30\%$  espermatozoides con motilidad progresiva. No aprobados=  $< 30\%$  espermatozoides con motilidad progresiva.

yen en la espermatogénesis de los equinos, como es: alimentación, edad, condición corporal y temperatura (17,18).

Los garañones durante la época no reproductiva continúan con su actividad reproductiva, aunque disminuida ya que se reduce el tamaño de los testículos, lo que ocasiona baja producción de testosterona, espermatozoides y disminuye el comportamiento reproductivo (19,20).

La ubicación geográfica influye en la estacionalidad reproductiva de los equinos, por medio de cambios en la duración del fotoperiodo, ya que en latitudes tropicales por debajo de 15°, el cambio anual no es suficiente para tener una estacionalidad estable. El control del fotoperiodo es más evidente en latitudes >30° (Norte o Sur), y aún en latitudes más altas, en la que los animales están expuestos a la luz constante durante el verano (21,22).

El volumen del eyaculado de un caballo varía entre 30-250 mL (23), por lo que los volúmenes que se obtuvieron en esta investigación de las diferentes razas están dentro de este rango. Existen varios factores que pueden afectar el volumen de semen obtenido en un semental como: raza, edad, frecuencia de recogida, nivel de estimulación o época del año (24,25).

A excepción de la raza Holsteiner no se determinó diferencias, entre la época reproductiva y no reproductiva en las razas evaluadas. La raza Holsteiner produjo un mayor volumen en la época no reproductiva en comparación con la época reproductiva, esto puede explicarse por la frecuencia de obtención de eyaculado en la época reproductiva, ya que existe una correlación negativa entre el volumen del semen y la frecuencia de obtención (24,26,27). La raza Cuarto de Milla obtuvo el menor volumen de eyaculado en ambas épocas (54 mL en promedio), mientras en el estado de Chihuahua ubicado al norte de México, se reporta un 63,5 mL por eyaculado (28°38'07"N) (28), que son volúmenes superiores a los reportados por Gottschalk *et al.* (29), quienes en Hannover, Alemania, que está ubicado a una mayor latitud (52°22'13.87"N) obtuvieron 37,9 mL de volumen. Mientras que la raza Frisón produjo el mayor volumen en comparación con las demás razas tanto en la época reproductiva y no reproductiva (87 y 93 mL, respectivamente), pero una investigación realizada en los Países Bajos, a una mayor latitud de 52°30'0"N, reportan 48 mL de eyaculado (30).

El porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva en semen fresco se asocia con una alta calidad de los espermatozoides, por lo que se considera que un garañón fértil debe presentar  $\geq 60\%$  de motilidad progresiva (1). Con excepción de la raza Frisona en la época no reproductiva, todas las demás razas se encontraron por encima del 70% de movilidad progresiva. No se determinó una diferencia, entre las razas evaluadas y la época reproductiva y no reproductiva de esta variable. Presentando los mayores porcentajes

de motilidad progresiva las razas Holsteiner, Española y Árabe. Se reporta que la raza Árabe casi no produce gel en su eyaculado (4), y esto puede ser la causa de una mayor movilidad de los espermatozoides.

Existen diversos factores que afectan la movilidad progresiva como son: temperatura, cambios osmóticos, manejo inadecuado del eyaculado, tipo de diluyente, tiempo entre la colección y evaluación de semen, edad, y uso de antibióticos en los diluyentes (20,29,31).

Existe una variación muy amplia en la concentración espermática por mL en equinos de 50 a 800 millones de espermatozoides por mL (25). El promedio de la concentración espermática por mL de las seis razas estudiadas se encontró dentro de este rango, siendo la raza Holsteiner la de mayor concentración (230 millones de espermatozoides por mL), y la Árabe menor concentración (96 millones de espermatozoides por mL), en la época reproductiva, mientras que, en la época no reproductiva, fue la raza Árabe (213 millones de espermatozoides por mL) y Española (85 millones de espermatozoides por mL), respectivamente. La concentración obtenida de la raza Holsteiner en esta investigación fue similar a lo descrito por Greiser *et al.* (13) (225 millones de espermatozoides por mL). No se observaron diferencias significativas, entre la concentración espermática por mL, obtenida entre la época reproductiva y no reproductiva, por lo que el fotoperiodo en latitudes cercanas al ecuador (19° y 20° latitud norte) no afecta la producción de espermatozoides en las razas estudiadas. Otro factor que influye la concentración espermática es la frecuencia de los eyaculados (20).

El número total de espermatozoides por eyaculado es importante, ya que con este se determina el número de yeguas que pueden ser inseminadas. Generalmente, el número total de espermatozoides en los eyaculados de sementales maduros oscila de 4 mil a 12 mil millones por eyaculado (32), pero en sementales sin actividad sexual puede ser de 15 mil a 20 mil millones por eyaculado (33). Es interesante que a latitudes cercanas al ecuador en donde se realizó la presente investigación, la concentración de espermatozoides por eyaculado fue similar entre la etapa reproductiva y no reproductiva en las seis razas evaluadas. Pero al analizar esta variable por raza se observó que dos sobresalieron; la Holsteiner y Warmblood durante época reproductiva, y la raza Holsteiner y Frison en la no reproductiva. La concentración obtenida en la raza Holsteiner (12613 millones de espermatozoides por eyaculado) fue mayor a lo reportado por Gottschalk *et al.* (29) ( $6300 \times 10^6$  por eyaculado). Lo mismo sucedió en la raza Frisón, donde la concentración obtenida durante la época no reproductiva (13750 millones de espermatozoides por eyaculado) fue mejor a lo reportado por Dini *et al.* (30) (5568 millones de espermatozoides por eyaculado). La concentración espermática está relacionada con la frecuencia en la obtención de

eyaculados, ya que a mayor frecuencia menor concentración de espermatozoides (22).

La cantidad de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado fueron similares entre la época reproductiva y no reproductiva en todas las razas estudiadas en latitudes cercanas al ecuador. Pero dentro de las razas, la Holsteiner obtuvo los mejores resultados tanto en la época reproductiva y no reproductiva (9498 millones y 9571 millones de espermatozoides motiles, respectivamente). La cantidad fue mayor de espermatozoides con motilidad progresiva por eyaculado en la presente investigación en las razas Holsteiner y Cuarto de Milla en comparación a lo reportado por Greiser *et al.* (13), con solo 4300 millones y 3400 millones de espermatozoides móviles por eyaculado, respectivamente. Entre los factores que pueden afectar esta característica seminal, se encuentra el manejo inadecuado de la temperatura, que afecte la integridad de la membrana plasmática (25).

El semen post-descongelado de equino debe tener  $\geq 30\%$  de motilidad progresiva para ser usado en IA (1,34,35), siendo utilizado este criterio en la empresa privada para la aprobación de los eyaculados posdescongelados. Se determinó que la congelación de semen en macrotubos con una concentración promedio de 700 millones de espermatozoides, produjo entre 14 y 17 dosis por eyaculado. Se ha demostrado que más del 80% de las inseminaciones con semen descongelado de equino tienen entre 400 y 500 millones de espermatozoides totales por dosis, siendo el sitio de la inseminación el cuerpo del útero (36).

Al congelarse el semen en pajillas de 0,5 mL con una concentración promedio de 160 millones, las dosis por eyaculado se incrementaron (32-46 dosis). Lo anterior es de gran importancia para realizar la IA profunda, reportándose una concentración de 50 y 100 millones de espermatozoides en volumen de 0,5 mL, que son depositados cerca de la unión útero tubárica, dentro del cuerno ipsilateral al ovario con el folículo ovulatorio, utilizando con mayor eficiencia el eyaculado de un semental, con resultados satisfactorios y alentadores (2). Otra ventaja del uso de dosis con poco volumen y concentración de semen descongelado es usarlo en yeguas con reacciones inflamatorias por el continuo estímulo del semen, cuando se inseminan varias veces, lo que no sucede al realizarse una vez mediante la IA profunda (36).

Se determinó una diferencia entre los eyaculados aprobados entre la época reproductiva ( $\geq 67\%$ ) y no reproductiva ( $\leq 50\%$ ), independientemente del crioprotector (amidas o glicerol) o envase usado para la congelación (pajillas o macrotubos), lo cual concuerda por lo reportado por Aurich *et al.* (35), quienes mencionan que la mejor época para congelar el semen de equino es durante la época reproductiva, siendo el verano el momento ideal.

No se observó diferencia entre los eyaculados aprobados en la época reproductiva (67% a 75%), inde-

pendientemente del crioprotector o envase de congelación, lo mismo se determinó en la época no reproductiva (47% a 50%). Se reporta que sólo 20-30% de los garañones producen semen con buena capacidad de congelación, 40-60% originan semen con capacidad aceptable (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación), y 20-30% de sementales producen semen que no es congelable, aunque se trate de animales con buenos índices de fertilidad en monta natural (25).

## CONCLUSIONES

Las evaluaciones de motilidad progresiva, concentración espermática (mL y eyaculado), y cantidad de espermatozoides con motilidad progresiva en las seis razas evaluadas, en latitudes cercanas al ecuador, fueron similares entre la época reproductiva y no reproductiva, excepto el volumen donde la raza Holsteiner varió entre las épocas. Destacándose que un mayor número de dosis son aprobadas después de la descongelación para usarse en IA, cuando los eyaculados se obtuvieron durante la época reproductiva en zonas con latitud cercana al ecuador, independientemente del tipo de crioprotector o envase utilizado para congelar.

## REFERENCIAS

1. Hernández AC, Zambrano VJ, Jiménez EC. Current trends on stallion semen evaluation: what other methods can be used to improve our capacity for semen quality assessment?. *Journal of Veterinary Andrology*. 2019; 4(1): 01-19.
2. Imposti CG. Inseminación Artificial con Semen Congelado en Profundidad con la Utilización de una Pajuela en Yeguas. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2018.
3. Miró J, Papas M. Improvement of cryopreservation protocol in both purebred horses including Spanish horses. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2018; 16(4): 1-8
4. Ghallab A, Abou-Ahmed M, Fad A, El-Badry D, Shahat A, Moawad A. Optimization of the protocol for Cryopreservation of Arabian Stallion Spermatozoa: Effects of Centrifugation, Semen extenders and Cryoprotectants. *Cryoletters*. 2019; 40(2): 129-138.
5. Vásquez AP. Influencia de la estación (invierno-primavera) sobre el volumen testicular y volumen del eyaculado en caballos inscritos en la asociación de criadores y propietarios del caballo peruano de paso de lambayeque. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario. Universidad Nacional "Pedro Ruiz Gallo", Perú. Repositorio Institucional: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20,500.12893/4540>. 2019.

6. Ebel F, Vallejos A, Gajardo G, Ulloa O, Clavel E, Rodríguez GJ, Ramírez RA. Semen quality and freezability analysis during breeding and non-breeding seasons in heavy draft stallions in southern Chile. *Andrologia*. 2020 52(11): e13797.
7. Jiménez ZE. Correlación entre el diámetro escrotal y características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la Costa. Tesis de grado Magister Scientiae en Producción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú). BAN: Repositorio Institucional: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/2,500.12996/5193>. 2022.
8. Rivera BEJ. Influencia del comportamiento reproductivo por acción del fotoperiodo en hembras caninas que habitan en la zona ecuatorial. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. Red de Repositorio de Acceso Abierto del Ecuador: <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10330>. 2021.
9. INEGI Condiciones Geográficas, Población y Desarrollo Económico del Distrito Federal y la Zona Metropolitana. Página Web [en línea]. Consultado 19 de agosto 2022. [https://paot.org.mx/centro/inegi/ambdf/condic.html#:~:text=El%20Distrito%20Federal%2C%20ubicado%20en,22%C2%B4%20de%20longitud%20oeste](https://paot.org.mx/centro/inegi/ambdf/condic.html#:~:text=El%20Distrito%20Federal%2C%20ubicado%20en,22%C2%B4%20de%20longitud%20oeste.). 2022.
10. Mapa Owje. Mapa de Hidalgo, México. Página Web. [en línea]. Consultado 19 de agosto de 2022. [https://mapas.owje.com/4996\\_mapa-de-hidalgo-estado-mexico.html](https://mapas.owje.com/4996_mapa-de-hidalgo-estado-mexico.html). 2022.
11. NOM-032-ZOO1995. Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO1995, Proceso zoonosanitario del semen en animales domésticos. Diario Oficial de la Federación, 14 de junio de 1995.
12. Hernández AC, Ramírez AL, Makloski C. Semen Evaluation. En R. Walton, R. Cowell, A. Valenciano, *Equine Hematology, Cytology, and Clinical Chemistry* (2º ed., pp. 257-274). USA: WileyBlackwell. 2021).
13. Greiser T, Sieme H, Martinsson G, Distl O. Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. *Theriogenology*. 2020;142: 8-14.
14. Wayne WD, Chad LC. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences* (pp. 161, 213). United States of America: WILEY. 2013.
15. Ramírez MJ. Determinación del fotoperiodo sobre la actividad ovárica en yeguas durante el año, en diferentes haras, en los departamentos de Guatemala, Sacatepequez y Escuintla. Tesis de Licenciatura Médico Veterinario, Universidad de San Carlos de Guatemala. Repositorio del Sistema Bibliotecario Universidad de San Carlos de Guatemala: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/4054/>. 2006.
16. Dutra MC, Graglia GF, Martínez PM. Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. Comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial (EQUIPRO™). Tesis de grado: Doctorado en Ciencias Veterinarias. Universidad de la Republica (Uruguay). Colibrí: Conocimiento libre Repositorio Institucional: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/2,500.12008/2739>. 2013.
17. Gerlach T, Aurich J. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*. 2000; 58(1): 197-213.
18. Díaz N. Características del eyaculado equino y variaciones estacionales. *Revisión Bibliográfica. Ciencia y Tecnología Ganadera* 2010; 4(1): 23-30.
19. Pereira LD, Ozanam PF, Roser JF. Reproductive characteristics of stallions during the breeding and non-breeding season in a tropical region. *Tropical Animal Health and Production*. 2012; 44(1): 1703-1707.
20. Kandiel MM, El K. Evaluation of semen characteristics, oxidative stress and biochemical indices in Arabian horses of different ages during the hot summer season. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2018; 19(4): 270-275.
21. Saad G, Barati F, Najafzadehvarzi H, Ashari M. Serum testosterone in Arabian stallions during breeding and non breeding seasons in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(62): 13636-13639.
22. Bustos OE, Torres DL. Reproducción Estacional en el Macho. *International Journal of Morphology* 2012; 30(4): 1279-2012.
23. McGowan M. Evaluation of the Fertility of Breeding Males. En D. Noakes, T. Parkinson, G. England, *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (10º ed., págs. 619-634). Inglaterra: ELSEVIER. 2019.
24. Najjar A, Benaoun B, Ezzaouia M, Ben MA, Magistrini M, Ben MM. Determination of Semen and Sexual Behavior Parameters of Arabian Stallions to be Selected for an Artificial Insemination Program under Tunisian Conditions. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 2010; 8(2): 173-177.
25. Gutiérrez CL. Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Tesis Doctoral: Universidad Complutense de Madrid: E-Prints Complutense: Repositorio Institucional de la UCM: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24898/>. 2014.

26. Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burguer, D., Hässig, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. 2003; 60(1): 453-461.
27. Sieme H. Semen Evaluation. En Samper, J. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (2° ed., págs. 57-74). Missouri: Saunders, ELSEVIER.2009.
28. Flores, U.M.P. Inmunofluorescencia del receptor de opiodes  $\mu$  en espermias de equino con alta y baja motilidad. Tesis Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Chihuahua. Repositorio Informático Institucional: <http://repositorio.uach.mx/172/> 2016.
29. Gottschalk M, Sieme H, Martinsson G, Distl O. Analysis of breed effects on semen traits in light horse, warmblood, and draught horse breeds. *Theriogenology*. 2016; 85(1): 1375-1381.
30. Dini P, Bartels T, Revah I, Claes A, Sout T, Daels P. A retrospective study on semen quality parameters from four different Dutch horse breeds with different levels of inbreeding. *Theriogenology* 2020; 157(1): 18-23.
31. Love C. Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 2016; 32(3): 531-546.
32. Stout T, Colenbrander B. Reproductive Parameters of Draft Horse, Friesian and Warmbloods Stallions. En A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, D. Varner, *Equine Reproduction* (2°ed., Vol. 1, pp. 1362-1366). WILEY-BLACKWELL.2011.
33. Brinsko T, Blanchard D, Varner J, Schumacher C, Love K, Hinrichs D, Hartman Examination of the Stallion for Breeding Soundness. En Brinsko, T, Blanchard, D, Varner, J, Schumacher, C, Love, K, Hinrichs, D, Hartman, *Manual of Equine Reproduction* (tercera ed., págs. 176-206). Mosby, ELSEVIER. 2011.
34. Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR. Advances in stallion semen cryopreservation. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*. 2016; 32(3): 521-530.
35. Aurich J, Kuhl J, Tichy A, Aurich C. Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals*. 2020; 10(6): 1033-1045.
36. Penino CN, María JE, Mattos CR. Inseminación artificial con semen congelado equino: reacción inflamatoria, transporte espermático y técnica de inseminación. *Veterinaria (Montevideo)*. 2020; 56(214): 1-8.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** Antonio Jersain Montiel Quiroga: **Investigación, metodología, recursos.** José Ernesto Hernández Pichardo: **Conceptualización, análisis formal, escritura del borrador original, redacción (revisión y edición).** Arianna Miranda Martínez: **escritura del borrador original, redacción (revisión y edición).** Jaqueline Posadas Rodríguez: **Curación de datos:** José Luis Rodríguez Suastegui. **Análisis formal, escritura del borrador original, redacción (revisión y edición).** Todos los autores revisaron y aceptaron la versión final del manuscrito.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)