

**Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con
el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino**

Jessica Valbuena Mafla



Universidad Antonio Nariño

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Programa Medicina Veterinaria

Popayán

2021

**Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con
el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino**

Jessica Valbuena Mafla

Trabajo de grado en modalidad de Monografía presentado para optar el título de:

Médico veterinario

Director grado:

MV. Esp. Jaime Andrés Pérez R.

Docente Universitario.



Universidad Antonio Nariño

Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia

Programa Medicina Veterinaria

Popayán

2021

○ **Dedicatoria**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por la vida y obtener un peldaño en mi formación personal y profesional.

A mi familia, por estar a mi lado siempre apoyándome, por su confianza, por darme ánimos para avanzar hacia el camino de éxito y por sus sonrisas alegrías que se han convertido en mi aliciente de cada día.

Y a todos los amigos y compañeros que me tendieron una mano, gracias por darme ánimos para avanzar hacia el camino de éxito profesional.

Jessica Valbuena Mafla

Nota de Aceptación

El trabajo en modalidad de Monografía de grado titulado: **Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino**, ha sido aprobado como requisito parcial para obtener el título de: Médico Veterinario.



_____**JAIME ANDRES PEREZ R**_____
Asesor Temático



DIEGO TOMAS HURTADO
Jurado



CARMEN ALICIA DAZA BOLAÑOS
Jurado

Popayán, noviembre de 2021

Tabla de contenido

Dedicatoria	3
Resumen	6
1. 8	
2. 10	
3. Justificación	12
4. Objetivos	14
4.1. Objetivo general	14
4.2 14	
5. Estado de arte	15
5.1. Estudios a nivel internacional.	18
5.2. Estudios a nivel nacional	23
6. Metodología.	50
6.1. Tipo de Estudio.	51
6.2. Población de estudio	51
6.3. Muestra	51
6.4. Fases metodológicas aplicadas	51
6.5. Criterios Metodológicos	52
6.5.1. <i>Criterios de Inclusión</i>	52
6.5.2. <i>Criterios de exclusión</i>	53
7. Discusión	54
8. Conclusiones	57
9. Recomendaciones	59
Bibliografía	61
Anexo A	68

Resumen

Los estudios microbiológicos han demostrado que muestras de semen de equinos sanos involucrados en programas reproductivos como el eyaculado equino artificial han evidenciado la presencia de microorganismos como *Chlamydia*, *C. burnetii* y *N. caninum*, *abortus equi*, *Leptospira spp.*, *Enrlichia risticii* y *Streptococcus zooepidermicus* que se pueden encontrar las condiciones óptimas para sobrevivir, ocasionando daños a los espermatozoides y desencadenando procesos de infertilidad o infecciones del tracto reproductivo, ante este hecho es prioritario conocer el funcionamiento de los microorganismos aislados en el semen, para poder diagnosticar y dar un tratamiento oportuno farmacológico y evitar la infertilidad por factores infecciosos generados por microorganismos. *Objetivo:* Describir los parámetros seminales y el crecimiento bacteriano del eyaculado en el equino para conocer los métodos de identificación de los microorganismos. *Metodología:* Se utilizó la revisión documental de tipo descriptivo y monografía de compilación, aplicando tres fases metodológicas como: 1. Identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del eyaculado en los equinos para determinar la clase de microorganismos presentados. 2. Analizar los métodos de evaluación seminal que se han implementado en diferentes estudios a nivel internacional y nacional para determinar las características y funcionalidades. 3. Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad, Para ello el estado de arte se concibió como base de argumentación de los principales autores de artículos indexados y estudios a nivel internacional y nacional que fueron fundamentales para describir y analizar los parámetros seminales y análisis del crecimiento bacteriano del eyaculado artificial del equino. *Recomendaciones:* Realizar una evaluación constante reproductiva a los sementales antes del inicio de la temporada reproductiva, implementar métodos para la identificación de los microorganismos y el uso de tratamientos farmacológicos. *Conclusiones:* El semen se contamina en el proceso de recogida mediante vagina artificial debido a que el método incrementa el crecimiento de bacterias en el prepucio y en la uretra de los machos, que hace que crezca una flora mixta con predominio de bacterias saprofitas como *E. coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

Palabras claves: *Parámetros seminales, crecimiento bacteriano, eyaculado equino.*

Abstract

Microbiological studies have shown that semen samples from healthy horses involved in reproductive programs such as artificial equine ejaculate have shown the presence of microorganisms such as Chlamydia, C. burnetii and N. caninum, abortus equi, Leptospira spp., Ehrlichia risticii and Streptococcus zooepidermicus, that the optimal conditions to survive can be found, causing damage to the sperm and triggering infertility processes or infections of the reproductive tract, given this fact it is a priority to know the functioning of the microorganisms isolated in the semen, to be able to diagnose and give a treatment timely pharmacological and prevent infertility due to infectious factors generated by microorganisms. Objective: To describe the seminal parameters and the bacterial growth of the ejaculate in the equine to know the methods of identification of the microorganisms. Methodology: A descriptive documentary review and compilation monograph were used, applying three methodological phases such as: 1. Identifying the peculiarities of the bacterial growth of the ejaculate in horses to determine the class of microorganisms presented. 2. Analyze the seminal evaluation methods that have been implemented in different studies at the international and national level to determine the characteristics and functionalities. 3. Determine the appropriate conditions and treatments for an effective equine reproduction of higher quality. For this, the state of the art was conceived as a basis for argumentation by the main authors of indexed articles and studies at an international and national level that were fundamental to describe and analyze the seminal parameters and analysis of the bacterial growth of the artificial ejaculate of the equine. Recommendations: Carry out a constant reproductive evaluation of stallions before the start of the reproductive season, implement methods for the identification of microorganisms and the use of pharmacological treatments. Conclusions: Semen is contaminated in the collection process using an artificial vagina because the method increases the growth of bacteria in the foreskin and in the urethra of males, which causes a mixed flora to grow with a predominance of saprophytic bacteria such as E. coli, Streptococcus, Staphylococcus, and Pseudomonas.

Key words: *Seminal parameters, bacterial growth, equine ejaculate.*

1. Introducción

El método de reproducción artificial llamado Eyaculado equino ha sido utilizado para la inseminación artificial en los últimos años debido a “las ventajas que aporta a la cría equina, destacando el aumento del número de yeguas cubiertas por cada semental, la mejora de los índices de concepción de algunos sementales y yeguas sub fértiles, la posibilidad de almacenamiento y transporte del semen y la disminución de los accidentes en los animales y las personas ocurridos durante la cubrición. Cuando este método reproductivo se aplica en forma adecuada puede dar como resultado tasas de concepción iguales o incluso superiores a las obtenidas mediante monta natural”. (Sánchez, 2012., p.11)

En este método reproductivo, “se utiliza una vagina artificial para la recolección del semen en los caballos, la mayoría de los sementales pueden ser entrenados para eyacular en una vagina artificial, pero en algunos casos y por diversas razones se debe emplear otros métodos alternativos que nos permiten obtener y evaluar una muestra representativa de la producción seminal”. (Usuga, 2017., p.35)

De esta manera se debe determinar a través de la matriz seleccionada para la investigación los resultados pertinentes para poder establecer los parámetros del crecimiento bacteriano del método artificial por eyaculado equino. “El caballo posee muchas enfermedades que los afectan algunas de ellas pueden ser prevenidas con la inmunización activa a través de vacunas virales o bacterias, o bien en forma pasiva mediante anticuerpos calostrales o sueros hiperinmunes. Otras, por seguimiento continuo y evaluaciones como la vagina artificial, además se puede tratar con medicación antibiótica, sueros específicos o en forma sintomática”. (Nachón et cold., 2005., p.6)

Esta monografía, está estructurada de la siguiente forma: Resumen, Introducción, Problema, Justificación, Objetivos, Estado de arte donde se referencia los estudios científicos del método reproductivo por Eyaculado equino y las Patologías microbianas que conlleva, farmacología, métodos de apoyo diagnóstico que miden los parámetros del crecimiento de bacterias. Metodología de investigación, en donde se relaciona el tipo de estudio, desarrollo de capítulos, y métodos y criterios de inclusión y exclusión. Conclusiones y resultados de la investigación.

Por último, se plantea una discusión partiendo del estado de arte y la recopilación de los artículos e investigaciones según criterios de inclusión, así mismo se describen las conclusiones según los objetivos planteados, la bibliografía y anexos.

2. Problema

En el ejercicio de este acto investigativo para esta monografía se plantea un acercamiento de observación sobre el método de inseminación artificial llamado Eyaculado Equino. En este orden de ideas “El hombre utiliza los procesos tecnológicos artificiales en el campo de la Medicina Veterinaria aplicados de manera directa o indirecta en la reproducción de los equinos, al ser una biotecnología para la reproducción, conlleva a tener un margen de error que se puede observar que incurren durante la cubrición”. (Losinno, 2007., p.54)

Por tanto, las Biotecnologías reproductivas han evolucionado cada vez más como lo es la inseminación artificial, la cual está siendo muy utilizadas a nivel internacional y Nacional para obtener una mayor eficiencia reproductiva y así sacar un mayor número de potros al año, las preocupaciones de los propietarios de equinos sementales han sido transmitidas a los Médicos Veterinarios, por causa de contaminación seminal, subjetivo al inadecuado uso de la técnica artificial llamada vagina artificial porque se ha observado el crecimiento de microorganismos bacterianos dañinos en el semen después de la práctica y en el descongelado del semen.

Es evidente que el método artificial de reproducción equina tiene muchas ventajas porque al tener semen congelado, se facilita agendar los envíos de semen a los diferentes lugares hasta ser utilizado al momento óptimo de la inseminación, porque es más seguro para el personal del criadero, igualmente brinda la posibilidad de transportar el semen a largas distancias antes de realizar la inseminación.

Pero, así como se encuentra ventajas en el método de reproducción de eyaculado equino, también se encuentra desventajas como son: “No contar con personal capacitado al momento de realizar la técnica, el semental debe estar entrenado a eyacular en la vagina artificial de no ser así se incurre en contaminación seminal colocando en riesgo la fertilidad porque puede disminuir al momento de trasportar semen refrigerado de algunos sementales, el cual también es usualmente reducido cuando se maneja semen congelado”. (Loomis, 2001, p.29)

- **3. Justificación**

Esta investigación monográfica, se justifica ante el interés de los propietarios de criaderos de caballos sementales, los profesionales en Medicina Veterinaria y zootecnistas, a tener un concepto más claro sobre las ventajas de la buena utilización de las biotecnologías reproductivas como es el método reproductivo por Eyaculado equino, y su impacto al momento de realizar la práctica, los cuales se ven reflejados tanto en el beneficio del equino como en lo económico.

Este trabajo se justifica por medio de la revisión bibliográfica de los diferentes estudios científicos académicos, que ayudan a analizar a través de los diferentes criterios de autores que refieren ante la reproducción artificial equina como es el método de Eyaculado equino y el crecimiento de bacterias, además para el investigador es muy importante porque facilita las experiencias en la metodología de la investigación y alienta a la participante a compartir estos estudios, opiniones y reacciones, y resultados desde la universidad y los profesionales de la Medicina Veterinaria.

Igualmente, esta investigación monográfica se justifica porque el tema de la reproducción artificial y la Inseminación Artificial en animales (IA) es una de las técnicas que ha sido muy estudiada por el campo profesional de la Medicina Veterinaria, además porque ha sido considerado como un método zootécnico de producción, la inseminación artificial es un conjunto de procedimientos para realizar la extracción del espermatozoide de un animal destinado como reproductor, y es muy interesante estudiar su conservación y su depósito por métodos instrumentales para poder dar un diagnóstico ante patologías presentes en la práctica.

Es muy importante dejar un documento soportado con estudios científicos sobre los métodos de Inseminación Artificial, que sirva como fuente de consulta desde la academia porque favorece el mejoramiento de las prácticas de inseminación artificial, y además para que el lector interesado encuentre los fundamentos elementales teóricos básicos sobre el método Eyaculado equino y una guía de los procedimientos prácticos de la Inseminación Artificial, también porque va indicar criterios sobre algunos aspectos como el mejoramiento de algunas características del semen de los equinos, que se pueda comprender como es colectado, el procesado, el almacenado y conservado del semen, lo que sin duda repercutirá en más investigaciones y actualizaciones sobre el método y los parámetros que competen a este estudio.

•

- **4. Objetivos**

- **4.1. Objetivo general**

Describir los parámetros seminales y el crecimiento bacteriano con el método reproductivo artificial del eyaculado en el equino, con el fin de conocer los métodos de identificación de los microorganismos.

- **4.2** *Objetivos específicos*

1. Identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del método reproductivo artificial del eyaculado en los equinos para determinar la clase de microorganismos presentados.
2. Analizar los métodos de evaluación seminal que se han implementado en diferentes estudios a nivel internacional y nacional para determinar las características y funcionalidades.
3. Determinar las condiciones por contaminación bacteriana en el manejo por eyaculado equino, para conocer las alternativas farmacológicas en un tratamiento adecuado diagnosticado en la medicina veterinaria.

- **5. Estado de arte**

Es de destacar que en el semen del equino se pueden encontrar algunos microorganismos que alteran las condiciones óptimas para sobrevivir, “ existen microorganismos que ocasionan daños a los espermatozoides de los equinos y desencadenan procesos de infertilidad o infecciones del tracto reproductivo, de tal manera se hace necesario las ayudas diagnósticas como las pruebas de laboratorio que encaminan a evaluar la capacidad del esperma, y por lo tanto es necesario, valorar la calidad del eyaculado recurriendo ayudas diagnósticas como lo es el espermiograma”.(Sánchez, 2011.,p.23)

En otras palabras, 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, teniendo en cuenta los valores normales de los parámetros seminales (Ver tabla Nro.1), para verificar que el semen sea de buena calidad; Además es muy importante analizar la concentración, vitalidad, motilidad progresiva y morfología del semen, los cuales van ayudar a diagnosticar los porcentajes de anormalidad y concentración bacteriana; de esta manera es necesario el análisis seminal en el equino, el cual permite observar y valorar el espermatozoide ubicado en la membrana plasmática”. (Seminario, 2020., p.10)

Tabla .1

Rango de valores normales de las características seminales de los equinos

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

Fuente: Muñoz & Palomar (2015), Técnicas empleadas para aumentar la calidad seminal en los caballos

A lo que refiere al crecimiento bacteriano del programa reproductivo de eyaculado del equino, las probabilidades de contaminación son muy altas, este es un punto muy importante para la investigación porque permite evidenciar que este método reproductivo artificial analizar puede generar microorganismos bacterianos las cuales pueden disminuir la viabilidad de las células espermáticas a través de mecanismos asociados a la apoptosis, como la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de caspasas”. (Usuga, 2017., p.26).

En este contexto, muchos de los equinos eyaculados artificialmente sanos se encuentran contaminados con microorganismos como son: *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (coagulasa-negativos) y de la clase Actino bacteria y una baja de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, de los géneros *Micrococos*, *Bacillus*, *Streptomyces* y

Streptococcus (alfa-hemolíticos) y de las Streptococcus (alfa-hemolíticos) y de las pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa y Streptococcus equino, los cuales podría esperarse que provengan de la mucosa del prepucio y la uretra”. (Kristula et. Cold, 2011., p.11).

El presente estado de arte, pretende lograr los propósitos, y requerimientos a través de una descripción metódica, ordenada de los objetivos trazados para esta investigación para describir y analizar las categorizaciones referentes a los parámetros seminales, el crecimiento bacteriano del eyaculado en el equino, y el conocimiento de los métodos de identificación de los microorganismos. El trabajo presenta tres capítulos: ***El primer capítulo; Identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del eyaculado en los equinos para determinar la clase de microorganismos presentados. El segundo capítulo; Analizar los métodos de evaluación seminal que se han implementado en diferentes estudios a nivel internacional y nacional para determinar las características y funcionalidades. Y el tercer capítulo; Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad.***

En esta revisión, se presentan puntos interesantes sobre estudios actualizados que nutren la investigación como son la descripción de los parámetros seminales y análisis del crecimiento bacteriano del eyaculado del equino, además de que conlleva al investigador a analizar las experiencias de los diferentes enfoques, para finalmente poder presentar las consideraciones finales de los estudios.

En este entorno, la investigación cuenta con una selección bibliográfica seleccionada a nivel internacional y nacional enfocadas hacia tres categorías básicas, las cuales se realizaron bajo los criterios y contextos en el área de la Medicina Veterinaria, por consiguiente:

○ 5.1. Estudios a nivel internacional.

Dentro de la categorización de los parámetros seminales, la patología de la azoospermia es un trastorno que se caracteriza por la ausencia de espermatozoides en el semen legando a la infertilidad, lo cual compromete la capacidad reproductiva del equino, por tal sentido;

En un estudio realizado en Tandil Buenos Aires, sobre la azoospermia como causa de infertilidad en los equinos, referido por Rodriguez et cold, (2018), argumenta que a raíz de un caso clínico que ocurrió en un Haras ubicado en la localidad de General las Heras, Provincia de Buenos Aires. Uno de los equinos que se encontraba en el establecimiento a travesaba un período de infertilidad, luego de realizarle un examen clínico reproductivo se le diagnóstico azoospermia subjetiva a crecimiento bacteriano. El estudio arrojó un hallazgo en la flora banal de la superficie del pene, glande y fosa del glande, consistente en una flora bacteriana que se caracteriza por mantener una cantidad importante de bacterias de las cuales ninguna tiene desarrollo sobre la otra como ejemplo *los lactobacilos, bacilos, estreptococos, estafilococos*, entre otro; esta estrategia impide que una especie en particular desarrolle y colonice la superficie y fosa del pene, aunque en muchos casos hay microorganismo que son considerados de alto riesgo como la *Klebsiella pneumoniae*, la *Pseudomonas aeruginosa*, la *Eschericha coli* y el *Streptococcus zooepidermicus* que generan esterilidad. El resultado mostro que, aunque los hechos no concluyeron que la *azoospermia*, se haya presentado por crecimiento bacteriano del eyaculado del equino causante de esterilidad, fue difícil determinar el origen de este desorden, por ello se tornó como un desafío y resultado fundamental para establecer un pronóstico, evaluar las opciones de tratamiento a los fines de intentar el retorno a la fertilidad". (p.19)

El anterior estudio ayuda a establecer la importancia de realizar una evaluación reproductiva a los sementales antes del inicio de la temporada reproductiva con el fin de prevenir eventuales problemas y evitar pérdidas productivas significativas.

Una de las categorías importantes para la investigación es el análisis de los parámetros seminales de esta manera es necesario estudiar la morfología del semen de los equinos, estudios demuestran que con la ayuda de marcadores moleculares como lo es la congelabilidad del semen equino se puede llegar a un diagnóstico temprano.

En un estudio realizado en España por González et al., (2016), acerca de la Vitricación de esperma de caballo empleando crioprotectores no penetrantes, del departamento de Medicina y Cirugía Animal; el objetivo fue disminuir el riesgo de transmisión de infecciones virales y bacterianas en los equinos, en el presente estudio se compararon los resultados de la técnica vitricación de esperma de equinos sujetos de estudio relacionados con los parámetros espermáticos respecto a la congelación convencional (motilidad, viabilidad, integridad acrosómica, integridad de membrana plasmática, fragmentación de ADN, crioprotención y potencial de membrana mitocondrial), para establecer un protocolo detallado del proceso. La *Metodología* que se utilizó fue empleando un 2 % de glicerol, se consiguió un movimiento progresivo del 45,6 %, algo superior a nuestros resultados (38,32 %), se obtuvo un movimiento progresivo del 16 %, claramente inferior a los resultados del presente trabajo de vitricación con sacarosa y BSA. de forma aislada resultó en un movimiento progresivo del 23% y una integridad de la membrana plasmática del 27,26 %; es destacable la diferencia existente en cuanto a la integridad de la membrana plasmática con nuestro trabajo (66,61 %). La acción protectora de la sacarosa sobre la membrana plasmática ya fue observada en estudios previos de vitricación. Como *conclusión*, se

estableció que esta protección es posible gracias al aumento de la viscosidad del medio que ocasiona la sacarosa, dificultando la formación y crecimiento de cristales de hielo y por tanto el daño en la membrana plasmática.” (p.34).

La técnica de vitrificación de espermatozoides equinos es un método muy eficaz porque permite la crio preservación, y así se disminuye el riesgo de transmisión de infecciones virales y crecimiento bacteriano en el eyaculado de equino lo que genera esterilidad, esta técnica permite la conservación del espermatozoides para inseminar las yeguas.

En este mismo entorno un estudio elaborado por Gutiérrez, (2014), en Madrid – España, ha realizado un estudio sobre “la optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen en equinos para los procesos de conservación debido a las altas tasas de esterilidad en los equinos machos”, el *objetivo*, se trató de estudiar la optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal equino, específicamente a través de la técnica de selección espermática de centrifugación coloidal incrementando el éxito obtenido con ella, la *Metodología*, que utilizó fue ovocitos de los espermatozoides equinos con el objetivo de ofrecer y analizar información sobre los métodos convencionales y recientes empleados para evaluar la fertilidad potencial del semen equino. Los *resultados*, arrojados obedecieron al bajo valor predictivo de la tasa de gestación equino, lo cual se pudo desarrollar nuevos métodos de análisis seminal, incorporado diversos recursos tecnológicos y mejorado las técnicas existentes, y en muchos casos adaptándolas a la especie equina (p.12).

Por lo anterior se pudo comprobar que la optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen en equinos sigue siendo de gran valor predictivo para los casos de infertilidad por crecimiento de bacterias en eyaculado equino que obstaculiza la reproducción.

Un estudio en Chile, por Vallejos, (2011), en la universidad de medicina veterinaria, se trabajó en los parámetros seminales realizando estudios enfocados a la activación del receptor u opioide en la longevidad y calidad espermática de equinos post descongelación, en eyaculados y células espermáticas epididimarias. Uno de los problemas que plantea este estudio fue el uso de semen refrigerado en la inseminación artificial es que pasadas las 24-48 h disminuye considerablemente su eficiencia en términos de fertilidad. Para solucionar dicho problema, resultó clave usar y/o desarrollar diluyentes de refrigeración que mantuviera intacta la calidad seminal. La presencia y funcionalidad de los receptores opioides en espermatozoides equinos, se presenta como una estrategia farmacológica para la refrigeración y crio preservación espermática en equinos. La *Metodología*, empleada evaluó el efecto de la activación del receptor μ -opioide sobre la longevidad espermática a 5° C y la viabilidad de espermatozoides crio preservados en nitrógeno líquido, los eyaculados fueron obtenidos de 7 sementales fina sangre tiro pesado, los que fueron mantenidos en diluyente de congelación experimental HM-0* Botu Crio(R), los epidídimos fueron obtenidos de castraciones de sementales y mantenidos en los mismos diluyentes mencionados anteriormente. La *Conclusión*, determinó la utilización del receptor opioide como blanco farmacológico en la ventana de refrigeración podría ser una estrategia viable, según muestran los resultados obtenidos, para lograr mejoras significativas en los parámetros espermáticos post descongelación” (p.45).

Se puede mencionar que la activación del receptor μ -opioide, usando fentanilo, mejora la longevidad de espermatozoides eyaculados y epididimarios mantenidos en refrigeración y mejora la viabilidad post descongelación e integridad acrosomal de las mismas células.

Igualmente, en México, ha estado involucrado en realizar estudios con el objetivo de disminuir las tasas de infertilidad de los equinos, en un estudio realizado por Gonzales, (2017),

llamado “Crio preservación en Espermatozoides obtenidos de cola de Epidídimo Equino”, en el objetivo principal, se enfocó a determinar el método adecuado para recuperar espermatozoides epididimarios en equinos en diferentes tiempos de recuperación post-mortem. De acuerdo a la *Metodología*, utilizada en epidídimos fueron transportados en solución de cloruro de sodio al 0.9% y almacenados durante 2, 4, 8, 12 y 24 horas, a 5°C, evaluando calidad espermática en los parámetros evaluados fueron: volumen, concentración, vitalidad, motilidad masal, motilidad individual, y espermatozoides normales. Los *Resultados*, arrojaron que los espermatozoides epididimarios mostraron: motilidad masal $60,4\% \pm 4,75$; motilidad individual $50,7\% \pm 4,75$; vitalidad $60,6\% \pm 3,85$; anormalidades $8,78\% \pm 1,4$; no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre protocolos, recogiendo volúmenes promedios de $2,2 \pm 0,5$ ml, y concentración de $63,08\% \pm 2,05$, el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor utilizando el método de lavado retrógrado $62,08 \pm 4,2$. Como *conclusión*, del estudio se pudo evidenciar que fue posible recolectar espermatozoides vivos del epidídimo directamente proporcional al tiempo de almacenamiento.

Los métodos de recolección utilizados fueron eficientes y repetibles, confirmando que es posible recolectar espermatozoides vivos y sanos libres de microorganismos bacterianos, siendo viable realizar recuperación y crio preservación de espermatozoides del epidídimo a partir de este material con cualquier protocolo seleccionado; lo que supone una técnica prometedora para conservar recursos genéticos.

○ 5.2. Estudios a nivel nacional

Los estudios científicos en el área de Medicina Veterinaria equina en Colombia no han avanzado al ritmo como se requiere en comparación a los estudios internacionales, como se puede evidenciar actualmente las universidades de Medicina Veterinaria son las que están liderando los estudios y se ha empezado avanzar un poco más en el tiempo.

En la ciudad de Medellín – Colombia, por Castro & González (2019), ha liderado estudios como el llamado “*Métodos modernos de Evaluación Seminal en Equinos*”, cuyo *Objetivo*, fue determinar una revisión a los diversos métodos y evaluación seminal que se han implementado tradicionalmente para determinar y conservar las características y funcionalidad adecuada de los espermatozoides en las muestras seminales. *Metodología*: Se realizaron equinos sanos según los parámetros establecidos en la crioterapia y diagnóstico en la macrobiótica seminal, se realizó un análisis computarizado del movimiento y morfología espermática, la función mitocondrial, la peroxidación lipídica en la membrana de los espermatozoides, la composición del plasma seminal, la integridad y funcionalidad del acrosoma no son más que un conjunto de factores que deben jugar a favor del momento de un eyaculado o de una inseminación ya que son indispensables para una fecundación óptima o de buena calidad.. *Resultados*: se pudo precisar que en la actualidad se puede evaluar la calidad del semen equino con mayor funcionalidad y eficacia, permitiendo procedimientos como la crio preservación entre otros, permitiendo un abordaje más adecuado en relación a las predicciones del genotipo, la selección de rasgos y nuevos referentes a una eficaz reproducción equina de mayor calidad (Castro & González, 2019, p.18).

En este estudio se reúnen las cualidades mínimas seminales equinas con la ayuda de los métodos de laboratorio para la evaluación del semen equino, es muy importante tenerlos en cuenta para los objetivos de esta investigación.

Para, Pérez (2018), en un estudio llamado “Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos”. En el objetivo principal, se trató de analizar los parámetros de motilidad, vigor, morfología e integridad de membrana plasmática para cada uno de los crio protectores. *Metodología:* Se estudiaron varios ejemplares equinos se tomaron muestras de cada eyaculado se dividió en dos alícuotas iguales al azar con variaciones en la adición del crio protector con Dimetilformamida 5% o glicerol 5%, y se congeló por el protocolo de crio preservación, con una curva de enfriamiento de 5°C durante 120 minutos y exposición a vapor de nitrógeno durante 15 minutos antes de ser sumergido al nitrógeno líquido. La viabilidad espermática (motilidad) fue evaluada mediante el test de termo resistencia, la morfología de las células se evaluó fijando el semen en formol salino y la integridad de la membrana plasmática de la cola del espermatozoide mediante el test hiposmótico. *Resultado:* Al evaluar el semen pos descongelación no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los dos crio protectores respecto a los parámetros evaluados. *Conclusión:* Los resultados nos permiten concluir que la utilización del medio extensor INRA 82 modificado con azúcares asociado a leche descremada con adición del 2% de yema de huevo, y a una curva de enfriamiento moderada de 120 minutos a 5°C, muestran efectos benéficos en los parámetros espermáticos pos descongelamiento de forma independiente al crio protector utilizado en los caballos criollos colombianos (p.15).

Otro estudio elaborado en la ciudad de Bello – Antioquia, por los investigadores, Usuga & Madriz (2018), realizaron una investigación sobre la “*Evaluación de marcadores moleculares y su relación con la congelabilidad del semen equino*”, el objetivo principal fue evaluar los marcadores moleculares en equinos de la raza criollo colombiano y su relación con la congelabilidad seminal. Según la Metodología, empleada, el material de investigación fue recolectado en el departamento de Antioquia (Colombia). Las muestras fueron procesadas y evaluadas en el laboratorio de Biotecnología animal del Centro de experimentación del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid ubicado en Bello, Antioquia. A 100 ejemplares equinos de la raza Criollo Colombiano, se les recolectó una muestra sanguínea para la evaluación de los marcadores genéticos, adicionalmente, a treinta ejemplares se les recolectó dos eyaculados (fracción espermática) por animal, empleando el método de vagina artificial, mediante una vagina modelo Missouri (Minitube). Con relación a los *resultados*, se encontró un efecto significativo SNP CRISP3 c.+199 A>G (SNP1) para todos los parámetros de calidad de semen fresco y post descongelación evaluados con excepción de VSL; de manera semejante, para el SNP- CRISP3 c.+566 C>A (SNP2) se encontraron efectos significativos para todas las variables de calidad seminal. *Conclusión*: el genotipo dentro de los SNPs evaluados, presenta un efecto sobre la calidad post-descongelación del semen equino” (Usuga & Madriz, 2018, p.56).

El estudio representa un material muy importante para esta investigación porque permite a estudiar los parámetros morfológicos de la vitalidad espermática del equino.

Es de destacar que las características del método eyaculado Equino, varían significativamente según las características bacterianas las cuales deben ser tratadas farmacológicamente, para los investigadores Pérez et cold (2017), fue muy significativo realizar un estudio sobre congelación de

semen equino bajo dos esquemas de adición de Dimetilformamida, según el *objetivo* principal, consistió en evaluar la calidad pos descongelación de semen equino sometido a dos esquemas de adición de Dimetilformamida (DMF) durante la congelación. *Metodología*: Se obtuvo el semen de cinco caballos criollos colombianos, el cual fue sometido a dilución en medio INRA82[®] modificado con dos tratamientos de adición de DMF: T1, adición inmediata de 5% de DMF; T2, adición fraccionada de 5% de DMF (durante 10 min). El semen se empacó en pajillas de 0.5 ml que se sometieron a congelación convencional, la morfología de los espermatozoides se evaluaron pre-yposdilución, adicionalmente, se realizó un análisis pos descongelación de la movilidad y de la cinética espermática mediante un sistema computarizado, y la evaluación de la integridad de la membrana plasmática por la prueba hipoosmótica (HOS). *Resultado*: Se observó una menor reducción de la movilidad espermática por la adición inmediata de DMF (T1) antes y después de la congelación, en comparación con la adición fraccionada del crio protector (T2) ($p < 0.05$), se encontraron valores superiores de movilidad total y progresiva pos descongelación para T1, mientras el índice de rectitud (STR) fue mayor para T2 ($p < 0.05$). *Conclusión*: la adición inmediata de DMF durante la congelación, provee una mayor protección de la movilidad espermática pos descongelación del semen equino, respecto a la adición fraccionada de este crio protector” (p.24).

Referente a la parte farmacológica, “el tratamiento con imipramina y detomidina, aumenta las contracciones de las ampollas del conducto deferente e inhibe la de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de menor volumen, mayor concentración espermática, menor pH y mayor número total de espermatozoides que una eyaculada in copula. Por otro lado, el tratamiento con prostaglandina F2alfa parece aumentar las contracciones de las glándulas accesorias resultando en

eyaculados de gran volumen, mucho gel, baja concentración, pH aumentado y número total de espermatozoides similar a la obtenida in copula”. (Pérez.,2017, p.11)

Tomando como referencia otro estudio en Colombia, que coincide en la ciudad de Medellín, investigadores del campo de la medicina veterinaria Restrepo et cold (2016), llevaron a cabo un estudio sobre “Proliferación Microbiana y Calidad Pos descongelación de Semen Equino Crio preservado en Presencia de Antibióticos”, los resultados obtenidos iniciaron con el objetivo general de evaluar el efecto de dos preparaciones antibióticas sobre el desarrollo microbiano y la calidad de semen equino crio preservado. *Metodología:* se obtuvo el semen de 10 caballos criollos colombianos que fue crio preservado por congelación convencional, con dos preparaciones antibióticas: P1 (penicilina 10000 UI/ml y estreptomycin 10 mg/ml) y P2 (penicilina 10000 UI/ml, estreptomycin 10 mg/ml y anfotericina B 25 µg/ml) y un grupo control sin antibióticos, posterior a la descongelación, se realizó la evaluación computarizada de la movilidad espermática, la prueba hipoosmótica (HOS) y el conteo de bacterias y hongos en el semen. El análisis estadístico se realizó mediante modelos lineales generalizados (GLM) y la comparación de medias por Tukey. *Resultado:* Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) para movilidad total (MT%) entre P1 (32.2 ± 17.6) y P2 (34.4 ± 19.1) con el grupo control (39.7 ± 16.5) y para movilidad progresiva (MP%) entre P1 (15.5 ± 14.8) con P2 (17.9 ± 16.5) y el control (19.6 ± 14.1). Para la proliferación microbiana se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) para bacterias (UFC/ml) entre P1 (167.7 ± 237.1) y P2 (240.1 ± 321.0) con el grupo control (464.4 ± 448.5). El uso de preparaciones antibióticas con penicilina, estreptomycin y anfotericina B en la crio preservación de semen equino reduce la proliferación de bacterias, pero produce una disminución en la movilidad espermática pos descongelación.

El estudio concluye que “el uso de preparaciones antibióticas de penicilina, estreptomicina y anfotericina, en la congelación de semen equino, constituye un método de control efectivo de la proliferación bacteriana pos descongelación, es así que se podría reducir los riesgos de infecciones en las yeguas, a causa de la inseminación artificial con semen congelado contaminado con bacterias; la proliferación de microorganismos, evidencia que estos pueden tener efectos negativos sobre los espermatozoides de los equinos”. (Restrepo et cold, 2016., p.9).

De esta misma manera el autor Restrepo (2013), “evaluó la Movilidad del Semen Crio preservado de Caballos Criollo Colombiano por un Sistema Analizador de Clase”, por tanto el objetivo principal fue evaluar la movilidad del semen crio preservado de caballos criollos. *Metodología:* Recolección de semen por un sistema analizador de clase de tres ejemplares equinos de raza criollo colombiano, ubicados en el municipio de Girardota (Antioquia), los cuales fueron sometidos a condiciones iguales de alimentación, ambiente, manejo general y reproductivo. Con una condición corporal de 6 a 7 (1-9). El procedimiento de recolección, se realizó utilizando una yegua y una vagina artificial modelo Missouri (Minitube), lubricada con gel no espermicida. La fracción en gel de cada eyaculado fue removida por filtración. *Resultado:* Se recolectaron tres eyaculados por animal, con un periodo de descanso sexual máximo de ocho días. El semen recién recolectado fue mantenido a 37°C y diluido en proporción 1:1, en un diluyente a base de leche descremada precalentado y antibióticos (EquiPro®, Minitube), a la misma temperatura, luego el semen fue transportado en refrigeración a 5°C, al laboratorio de Biotecnología Animal (p.25).

A continuación, se esbozará los capítulos respectivos, los cuales darán claridad de los objetivos específicos, teniendo en cuenta las tres categorías en la monografía.

➤ ***Primer Capítulo. Identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del Eyaculado en los Equinos para determinar la clase de microorganismos presentados.***

El cultivo bacteriológico del semen de los equinos es de mucha utilidad para determinar la influencia de la contaminación bacteriana del semen sobre la fertilidad.

“Los estudios microbiológicos son muy importantes para la evaluación de las características morfológicas de los espermatozoides del equino, las cuales van ayudar a identificar espermatozoides normales de los anormales, uno de los métodos utilizado dentro de la microbiológica es la tinción como el de eosina – nigrosina para evaluar vitalidad, al igual de la técnica de solución salina de formol tamponada con microscopía de fase de contraste que proporciona una resolución mejorada”. (Johannisson et al, 2009., p.45)

De esta manera la metodología utilizada en la microbiología veterinaria “permite evaluar la morfología de los espermatozoides y las distintas anomalías de cabezas y piezas intermedias, acrosomas anormales, de presencia de gotitas proximal y distal, cabezas desprendidas, piezas intermedias y colas dobladas, colas en espiral y células germinales prematuras”. (Johannisson et al, 2009., p.49)

Por consiguiente, las anomalías detectadas pueden indicar las condiciones contaminantes del esperma presentándose colas en forma de orquilla, gotitas de cristales y cabezas anormales separadas. En otros casos también puede presentarse anomalías transitorias que pueden deberse a disfunción testicular cuando se observa colas en espiral, células germinales prematuras y cabezas y piezas intermedias”. (Johannisson et al, 2009., p.55)

El estudio bacteriológico y Microbiológico veterinario es capaz de aportar la información necesaria para el conocimiento de la etiología de todas las enfermedades infecciosas, y además sienta las bases de la medicina preventiva, lo que constituye el principal objetivo de la Medicina veterinaria que es proteger la salud de los animales y proteger la salud pública. “La técnica de Separación del Plasma seminal, se realizan para aumentar la calidad del esperma del equino, ya que eliminan aquellos espermatozoides con alteraciones, contaminados o muertos, pues afectan a los demás, reduciendo así su viabilidad”. (Johannisson et al, 2009., p.66)

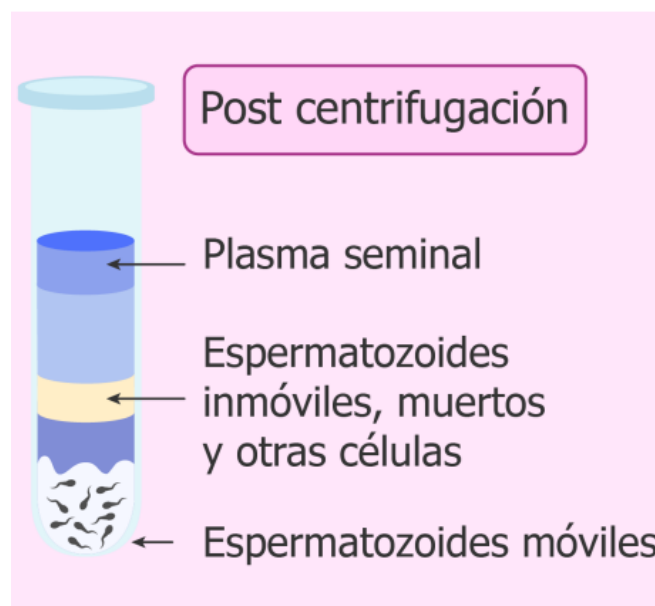
“Al momento de la evaluación se debe proveer al esperma un medio controlado que no cause cambios drásticos a su normal funcionamiento y por ende de resultados equivocados. Para proceder con la visualización del semen equino en estudio se deben utilizar microscopía adecuada de contraste x20 y x40 objetivos, el aumento final debe ser de x200 y x400 respectivamente, el microscopio usado debe tener una temperatura ajustada a 37°C”. (Johannisson et al, 2009., p.88)

La técnica convencional de evaluación espermática equino sigue siendo de gran valor predictivo, ya que, a pesar de proveer una apreciación indirecta de la capacidad fecundante, va ayudar a evidenciar la presencia de semen contaminado, es así que la Prueba bacteriológica técnica en el semen equino 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 que 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”. (Ramirez, 2013., p.80)

Figura 1.

Prueba bacteriológica técnica seminal en equino



Fuente: Muñoz & Palomar (2015), Técnicas empleadas para aumentar la calidad seminal en los caballos

En ese orden de ideas las patologías bacterianas del semen equino están muy relacionadas con enfermedades asociadas con bacterias y virus como lo es el virus de la arteritis equina (VAE) que es sumamente contagioso y se difunde a través del semen de los sementales infectados o a través de las secreciones respiratorias de cualquier caballo infectado con el virus. Aunque habitualmente provoca una infección subclínica, puede provocar un proceso agudo de arteritis vírica equina (AVE) que daña los vasos sanguíneos del caballo”. (Heyne, 1979., p.13)

La arteritis equina (VAE) “causa un cuadro similar a una gripe, así como abortos y potros débiles, los caballos portadores no muestren síntomas y, por lo tanto, los abortos o los potros enfermos atribuibles a esta enfermedad no siempre se diagnostican correctamente”. (Heyne, 1979., p.15)

Igualmente, el Herpervirus Equinos es un virus que puede provocar enfermedades como abortos y alteraciones neurológicas, infecta al equino y puede permanecer por mucho tiempo y se puede reactivar súbitamente”. (Pérez, 1980., p.11)

La metritis contagiosa equina (MCE) es una enfermedad venérea altamente transmisible de los caballos. “Esta enfermedad puede propagarse rápidamente desde un portador asintomático, principalmente un semental; Los machos la sufren de modo asintomático, esto hace que lo transmitan fácilmente al no resultar sospechosos para el propietario, la bacteria permanece en el esperma y en la uretra (que pasan a ser zonas reservorio del germen) y el semental se convierte en un portador asintomático”. (Pérez, 1980., p.19)

La metritis equina, “afecta igualmente a las yeguas en el endometrio del útero en el momento de la monta con descarga mucopurulenta vía vaginal a los 2-7 días de la monta o inseminación artificial. Pero también pueden no presentar casi síntomas, excepto un aumento de duración del periodo de diestro (parte del ciclo estral que va entre celo y celo) o infertilidad. Un aborto temprano también nos puede hacer sospechar de esta infección; Las yeguas también pueden ser portadoras asintomáticas con reservorios de bacterias en la fosa del clítoris, así pueden transmitir la enfermedad a otro macho al no resultar sospechosas, también es un modo de transmisión al potro en el nacimiento, convirtiéndose en un portador asintomático, los animales infectados no desarrollan inmunidad a largo plazo, por lo que pueden volver a padecerla. También puede haber

transmisión por falta de higiene en el material utilizado en exploraciones o en el propio material de inseminación, la inseminación artificial con semen contaminado también produce contagio”. (Pérez, 1980., p.23)

De igual manera, “la vesiculitis seminal es una afección caracterizada por la inflamación de las vesículas seminales, también conocidas como glándulas seminales. Estas vesículas son las productoras de la mayor parte del líquido seminal, en concreto, de un 60%”. (Anguiano, 2018., p.7)

Esta patología vesicultitis “es una enfermedad infectocontagiosa de los caballos causa por un vesiculo virus del cual hay dos serotipos de mayos importancia clínica en América del norte, cepa New jersey y cepa indiana, se trasmite por contacto directo y como todos los arbovirus, lo hace también a través de insectos mosquitos mosca”. (Anguiano, 2018., p.9)

Referente a la macrobiótica de los equinos, es importante mencionar que, “así como existen bacterias muy dañinas y perjudiciales para los equinos también existe una flora bacteriana que están presente en el semen del equino de manera normal; En un estudio realizado a 88 muestras de semen fresco de equinos obtenidas de semen, uretra, y prepucio de potros sanos expresadas porcentualmente se puedo observar bacterias existentes en potros sanos”. (Hernández et cold, 2015., p.78)

Tabla 2.

Microorganismos aislados de 88 muestras de semen fresco de moruecos. Se indica el porcentaje y entre paréntesis el número total de aislamientos

Microorganismo	Frecuencia
<i>Corynebacterium renale</i>	81,8 (72/88)
<i>Pasteurella multocida</i>	15,9 (14/88)
<i>Staphylococcus spp</i>	14,7 (13/88)
<i>Escherichia coli</i>	11,3 (10/88)
<i>Streptococcus spp</i>	4,5 (4/88)
<i>A. pyogenes</i>	4,5 (4/88)
<i>Manhemia haemolytica</i>	2,5 (2/56)
<i>Proteus</i>	1,8 (1/56)
<i>Entereococcus</i>	3,1 (1/32)
<i>Moraxela</i>	6,3 (2/32)
<i>Microbacterium</i>	18,8 (6/32)
<i>Artrobacter</i>	15,6 (5/32)
<i>Propionibacterium acnes</i>	6,3 (2/32)
<i>Aerococcus viridians</i>	3,1 (1/32)
<i>Staphylococcus xilosus</i>	3,1 (1/32)
<i>Streptococcus urealyticus</i>	3,1 (1/32)

Fuente: Hernández (2015), se indica el porcentaje y entre paréntesis el número total de aislamientos

El semen contaminado de equinos puede representar una fuente importante de transmisión artificial a las yeguas; El semen contaminado tiene unas características muy específicas, en primer lugar, los espermatozoides normales tienen cabeza ovalada y cola larga, los espermatozoides contaminados tienen defectos en la cabeza o la cola, como una cabeza grande o deformada o una cola doble o torcida., su morfología del esperma no se entiende bien y puede ser subjetiva, por otra parte las puntuaciones pueden variar en la misma muestra de semen, en el mismo laboratorio, usando las mismas técnicas de puntuación al estudiar su morfología se debe evaluar los siguiente: Volumen de semen, Cantidad total de espermatozoides, Concentración de espermatozoides, Vitalidad (porcentaje con vida), Movimiento (motilidad) .“ (Varner, 1998., p.120)

El semen contaminado afecta la flora bacteriana del semen del equino o induce a procesos inflamatorios en el tracto genital de la hembra, cuando la flora normal es alterada, bacterias potencialmente patógenas por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsella pneumoniae*, pueden colonizar el pene y el prepucio del equino. se han implicado a estas bacterias como agentes responsables de metritis, cervicitis, esterilidad y aborto de las vacas. (Hugges et cold., 1967., p.66)

Para poder analizar el crecimiento bacteriano del semen del equino con método artificial de eyaculado equino, es importante resaltar el estudio realizado por los autores Giovanni Restrepo et cold, (2016) “Proliferación Microbiana y Calidad Pos descongelación de Semen Equino Crio preservado”,

“Se evaluó la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante la prueba hipoosmótica (HOS). Para esto, se tomaron 100 µl de semen y se adicionaron a un tubo con 500 µl de una solución hipoosmótica de sacarosa 5.4%(100 mOsmol/l). La mezcla fue incubada a 38.5 °C por 30 min y luego se evaluó, mediante microscopía, la reacción (turgencia) de 200 espermatozoides en un mínimo de cinco campos de observación. La siembra de semen descongelado se realizó por triplicado para cada eyaculado y tratamiento”. (Giovanni, et cold, (2016., p.320)

“Se empleó el método de siembra en superficie con asa de vidrio en una cámara de flujo laminar. Para el cultivo de bacterias se utilizó agar nutritivo (OxoidCM0003, Thermo Scientific), preparado en una proporción de 28 g/l. Se realizó la incubación a 37 °C durante 48 h y el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) se hizo en un contador de colonias de campo claro (Centricol). Para el cultivo de hongos se preparó agar PDA (Oxoid CM0139, Thermo Scientific) en una proporción de 39g/l. Se realizó en cajas de Petri que fueron mantenidas a temperatura

ambiente (22 °C aprox.), durante 8 días, después de las cuales se realizó el conteo de las UFC. En ambos casos (bacterias y hongos) se cultivaron 50 µl de semen en 18 ml de agar por caja de Petri. (Giovanni, et al., (2016., p.320)

Tabla 3.

Calidad seminal (media ± desviación estándar) pos descongelación de semen equino, según la suplementación con antibióticos y micóticos por tratamiento (40 muestras por tratamiento)

Tratamiento ¹	MT ² %	MP %	VCL µm/s	VSL µm/s	VAP µm/s	HOS %
P1	34.4±19.1 ^a	17.9±16.5 ^a	70.8±23.5 ^a	36.6±13.6 ^a	48.5±20.7 ^a	33.0±12.8 ^a
P2	32.2±17.6 ^a	15.5±14.8 ^b	67.9±22.4 ^a	33.8±14.6 ^a	48.4±18.9 ^a	31.7±13.0 ^a
Control	39.7±16.5 ^b	19.6±14.1 ^a	71.2±22.8 ^a	34.5±12.9 ^a	48.1±17.7 ^a	30.9±13.5 ^a

¹ P1: Penicilina 1000 UI/ml, estreptomicina 1 mg/ml; P2: Penicilina 1000 UI/ml, estreptomicina 1 mg/ml, anfotericina B 2.5 µg/ml

² MT: movilidad total; MP: motilidad progresiva; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad media; HOS: integridad de membrana plasmática

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas denotan diferencia estadística significativa (p<0.05)

Fuente: Restrepo et al. (2016). "Siembra de semen de equino descongelado mostrando la proliferación de bacterias en agar nutritivo.

Tabla 4

Proliferación microbiana (media ± desviación estándar) pos descongelación de semen equino, según la suplementación con antibióticos y micóticos por tratamiento

Tratamiento	n	Bacterias UFC/ml	Hongos UFC/ml
P1	30	240.1 ± 321.0 ^a	1.7 ± 1.0 ^a
P2	30	167.7 ± 237.1 ^a	1.5 ± 0.8 ^a
Control	30	464.4 ± 448.5 ^b	1.7 ± 0.8 ^a

¹ P1: Penicilina 1000 UI/ml, estreptomicina 1 mg/ml; P2: Penicilina 1000 UI/ml, estreptomicina 1 mg/ml, anfotericina B 2.5 µg/ml

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas denotan diferencia estadística significativa (p<0.05)

Fuente: Restrepo et al. (2016). "Siembra de semen de equino descongelado mostrando la proliferación de bacterias en agar nutritivo.

Los resultados del estudio evidenciaron que, “a partir de 10 eyaculados provenientes del mismo número de reproductores, se procesaron y congelaron 120 pajillas de semen (40 pajillas por tratamiento). Se encontraron coeficientes de variación entre 20 y 40% para VCL, VSL, VAP y HOS, entre 40 y 60% para MT, HOS y proliferación de hongos, y mayores de 60% para MP y proliferación de bacterias. El efecto individual del equino (eyaculado) fue significativo (para todas las variables”. (Giovanni, et cold, (2016., p.320)

Las tablas Nro. 3 y 4. representan la incidencia de crecimiento bacteriano del semen equino al igual los parámetros de calidad seminal para su tratamiento. “La MT fue estadísticamente mayor para el grupo control respecto a las preparaciones antibióticas 1 y 2 (p que la MP fue menor en el tratamiento P2 con relación a P1 y al grupo control, por otro lado, no se halló diferencia estadística entre tratamientos para los parámetros de cinemática de los espermatozoides (VCL, VSL y VAP) y para la integridad de la membrana plasmática (HOS)”. (Giovanni, et cold, (2016., p.320)

Otra técnica muy eficaz para medir la proliferación de contaminación en el semen es la técnica de Separación del plasma seminal, “es una técnica que se diluye 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 esperma siendo un método eficiente y práctico. Esta técnica tiene una menor pérdida de espermatozoides que con la centrifugación”. (Santamaría, 2002.p.13)

Por otra parte, hay factores ambientales que predisponen a las bacterias oportunistas en los caballos, una de ellas son las dermatosis, que “es una enfermedad bacteriana de piel causada

comúnmente por *Staphylococcus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Dermatophilus congolensis*, *Actynomices spp*, *Brucella abortus*, los signos clínicos más comunes asociados a infecciones bacterianas de la piel son costras, pápulas, abscesos, y zonas de drenaje; las últimas dos lesiones se asocian más comúnmente a C, es importante para el diagnóstico y tratamiento de las diferentes dermatopatías causadas por bacterias realizar una adecuada exploración clínica basada en el uso correcto de exámenes complementarios y el conocimiento de la historia del caballo, datos que deben ser analizados de manera correcta para llegar a un diagnóstico certero y con ello realizar el tratamiento antimicrobiano más efectivo”. (Reed, et cold, 2005., p.18)

Hay factores ambientales muy agresivos para los equinos, porque “las superficies dérmica y mucosa proporcionan una barrera protectora que preserva la vida, compuesta por defensas físicas, químicas y microbianas, la flora normal contribuye con esta barrera protectora contra los patógenos y, a su vez, aporta paradójicamente, una fuente para posibles invasiones protectora contra los patógenos y, a su vez, aporta paradójicamente, una fuente para posibles invasiones oportunistas. Las bacterias comensales son aquellas que se benefician por vivir sobre o dentro de un huésped sin crear peligro. Para que una relación sea la de comensal debe haber un beneficio mutuo y la interrupción de esta asociación da lugar al desarrollo de una anomalía o una enfermedad en el huésped. Un patógeno es cualquier microorganismo productor de una enfermedad; de esta manera, un microorganismo comensal tiene la posibilidad de ser patogénico”. (Reed et al., 2005)

De esta manera, “la combinación de la flora normal y la inmunidad de las mucosas proporcionan una barrera eficaz contra la colonización infecciosa de las superficies cutáneas no interrumpidas, la mayoría de los microorganismos son encontrados en las capas más superficiales

de la epidermis y en la parte superior del folículo piloso, la mayoría de las bacterias y hongos localizados sobre la superficie de la piel no están asociados con enfermedad, sin embargo, las levaduras y las bacterias que se sitúan dentro de los folículos pilosos tienen una mayor probabilidad de estar relacionadas con un proceso patológico. Patológico”. (Reed et al., 2005., p.22)

Aun cuando los caballos vivan en un ambiente muy contaminado con flora fecal, “la flora dérmica normal de ésta especie estará asombrosamente desprovista de miembros de la familia Enterobacteriaceae, los habitantes normales incluyen poblaciones mixtas de bacterias de las especies de *Acinobacter*, *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* y *Streptococcus* no hemolíticos. Ciertos *Staphylococcus* spp se han asociado con enfermedades cutáneas del caballo y éstos incluyen *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*, mientras que especies tales como *S. xylosum* y *S. sciuri* se asocian con mayor frecuencia con la piel normal”. (Reed et al., 2005., p.22)

Si no se tiene los cuidados adecuados y si se insemina una yegua con semen contaminado, perjudica notablemente el proceso reproductivo de los equinos, se puede ver afectado por microorganismos como los virus y bacterias; que pueden causar directamente el aborto durante el proceso de gestación en las yeguas, con posibles complicaciones en la integridad del animal, pero también provocan perjuicios económicos para los propietarios, los abortos se dan ante la interrupción de la gestación en la yegua que termina con la expulsión del feto; debido a síntomas clínicos causados por estas enfermedades transmisibles con efectos lesivos para el animal, en especial en la placenta donde se denotan lesiones importantes, que han llevado a la muerte durante la etapa gestación o durante la expulsión del feto, que muestra la necesidad de avanzar en

tratamientos veterinarios para evitar estas patologías, entre las enfermedades infecciosas por virus que pueden causar abortos epidémicos y hasta la muerte en las yeguas, se tienen las siguientes: anemia infecciosa equina, arteritis vírica y los herpes virus equinos tipo 1 y 4, que son trasmisibles a través de las vías respiratorias o venéreas, contagiando a los animales susceptibles a las cepas de los virus causantes de síntomas clínicos, que afecta la integridad del equino. En el caso de los abortos causados por enfermedades por bacterias, se tienen: *Leptospirosis*, *Salmonella abortus equi*, *Ehrlichia Risticii*, y *Streptococcus zooepidermicus* entre otros, que se contagian por vías, como: la hematógena, local y la ascendente, que pueden provocar lesiones histopatológicas en el feto, cuya consecuencia final es la muerte del mismo”. (Reed et al., 2005., p.32)

Teniendo todas estas complejidades patológicas en los equinos los médicos veterinarios y los dueños de los hatos, deben tener en cuenta todo esto y utilizar adecuadamente el método de reproducción del eyaculado artificial en los equinos, “el cual tiene unas variaciones estacionales que resultan de interés a la hora de establecer el programa reproductivo para los sementales” (Díaz, 2010.)

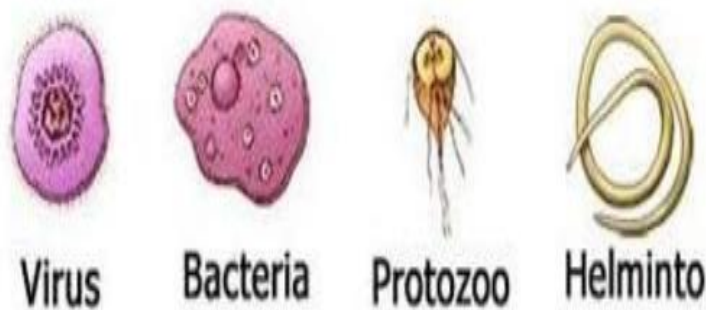
Igualmente, se puede identificar en el método de eyaculado en los equinos una relación que haya un volumen considerable de semen que varía entre 50 y 300 ml y está integrado por tres ondas eyaculatorias que en tiempos distintos se vierten sobre el colector. La primera procede de la próstata, es rica en electrolitos y de efectos espermio-estimulantes; la segunda procede de las ampollas de Henle y contiene los espermatozoides y la tercera procede de las vesículas seminales, que proporcionan la mayor parte del volumen al eyaculado y, desde el punto de vista biológico, representa un medio de tamponización y, por tanto, de protección biológica a los espermatozoides”. (Caiza et cold., 1997, p.6)

En este entorno, se ha observado que “el método permite un crecimiento bacteriano de microorganismos que se produce cuando el contacto directo con la uretra e indirecto con la vejiga y el trigono vesical a través del poro urinario interno genera un factor de riesgo de infección ascendente o sistémica de las glándulas, como en el caso de las vesiculitis infecciosas. Adicionalmente, una disfunción neuromuscular podría alterar la acción eficiente de los orificios eyaculatorios y del cierre efectivo del meato urinario interno, el cual podría generar contaminación con microorganismos bacterianos en el semen con orina”. (Rodríguez, 2015., p.10)

En este entorno, este método artificial tiene altas probabilidades de contaminación por bacterias que pueden ocasionar daños en su función reproductiva llegando hasta la esterilidad del equino, las bacterias patógenas, segregan toxinas dentro del torrente sanguíneo capaces de provocar cuadros infecciosos.

Figura 3.

Microorganismos causantes de enfermedades infecciosas Fuente



Fuente: López (2013)

Como se puede analizar existe la presencia y frecuencia de microorganismos y gérmenes saprofitos aerobios que se encuentran en el tracto genitourinario de los equinos, en este sentido contaminan el semen en el momento de la recogida con vagina artificial”. (Ortega et al., 2009, Neto et al., 2015)

En muchos casos “el semen de los equinos se contamina en el proceso de recogida mediante vagina artificial debido a la presencia de bacterias en el prepucio y en la uretra de los machos, que hace que crezca una flora mixta con predominio de bacterias saprofitas como *E. coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*” (Belanski, 2007; Otter, 2008; Ortega et al., 2009; Yániz et al., 2010; Ghoneim et al., 2014).

Bien que, la presencia de esta flora bacteriana no implica la transmisión de enfermedades a través de la inseminación artificial, en estudios realizados ha dado positivo para microorganismos *Brucella ovis*, *Actinobacillus* patógenos en el semen de equinos, con técnica realizada con PCR múltiple”. (Palomares e tal., 2005).

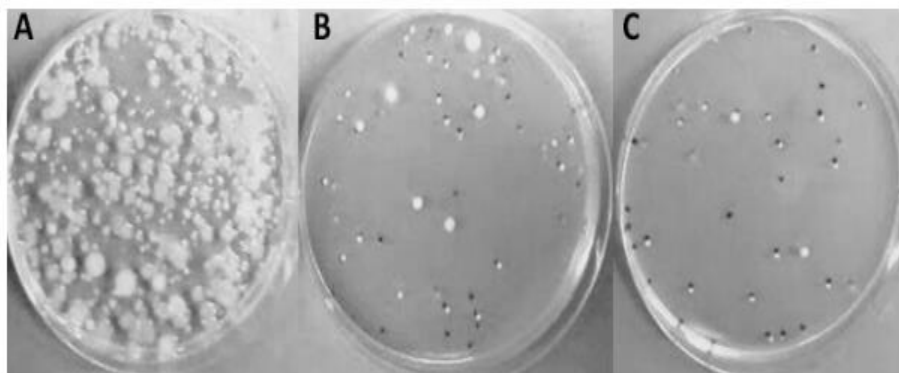
En virtud de lo anterior es necesario resaltar que los microorganismos bacterianos, tienen una causa, un origen, y una transmisión del agente infeccioso, además tienen sus funciones en vías de eliminación, resistencia en el ambiente, vectores, puertas de entrada, etc., que interrumpen en la cadena epidemiológica”. (Caro y Gutiérrez, 1999).

Algunos antibióticos pueden ser perjudiciales para el espermatozoide es por eso que “su manejo debe ser llevado profesionalmente para poder efectuar un tratamiento curativo, sea porque el agente microbiano provoca lesiones irreversibles en el huésped o porque éste actúa como reservorio de la enfermedad y la propague dentro de la población equina de por vida”. (Caro y Gutiérrez, 1999).

Cabe mencionar también, que el estudio realizado por Restrepo et cold (2016), sobre la Proliferación Microbiana y Calidad Pos descongelación de Semen Equino obtenido por método artificial y sometido mediante Crio preservado en Presencia de Antibióticos, mostró la proliferación de bacterias y desarrollo microbiano.

Figura 4.

Microorganismos y calidad de semen equino crio preservado con antibióticos



Fuente: Restrepo et cold (2016). “Siembra de semen de equino descongelado mostrando la proliferación de bacterias en agar nutritivo.

A: grupo control (sin antibiótico). B: Preparación antibiótica 1 (Penicilina 1000 UI/ml, estreptomycin 1 mg/ml); C: Preparación antibiótica 2 (Penicilina 1000 UI/ ml, estreptomycin 1 mg/ml, anfotericina B 2.5 μ g/ml)” (p.6).

La Figura 3, “muestra la proliferación de colonias de bacterias de muestras seminales descongeladas que fueron cultivadas en agar nutritivo. Los coeficientes de correlación entre la proliferación bacteriana y los parámetros de calidad seminal MT, MP y HOS fueron de -0.29, -0.21 y -0.45”. (Restrepo et cold ,2016., p.6)

En conclusión, el estudio muestra “que la mayoría de los eyaculados recolectados de animales sanos se encuentran contaminados con microorganismos los cuales podría esperarse que provengan de la mucosa del prepucio y la uretra al igual en el semen equino se ha reportado una moderada incidencia de los de microorganismos bacterianos como *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (coagulasa-negativos) y de la clase Actino bacteria, De igual forma, se reporta una

baja incidencia de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, de los géneros Micrococcus, Bacillus, Streptomyces y Streptococcus (alfa-hemolíticos) y de las bacterias Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa y Streptococcus equi, entre otras Madsen”.”. (Restrepo et cold ,2016., p.6)

El estudio concluye, que “el uso de preparaciones antibióticas de penicilina, estreptomocina y anfotericina B, en la congelación de semen equino, constituye un método de control efectivo de la proliferación bacteriana pos descongelación, Es así que se podría reducir los riesgos de infecciones en las yeguas, a causa de la inseminación artificial con semen congela- do contaminado por método artificial de eyaculado; sin embargo, se requiere continuar con la investigación de alternativas de control antimicrobiano en el semen crio preservado, dada la reducción en la calidad espermática generada por el uso de antibióticos”. (Restrepo et cold ,2016., p.10)

➤ ***Segundo Capítulo. Analizar los Métodos de Evaluación de Eyaculado Seminal de Equinos que se han implementado en diferentes estudios a nivel internacional y nacional, para determinar las características y funcionalidades.***

Los parámetros para la evaluación seminal son la parte fundamental para dar un diagnóstico al crecimiento de bacterias en eyaculado equino, el más tradicional es el Espermiograma, de tal forma que para Dorado (2019), determina que:

[...] “la recogida de semen por espermiograma es el método de elección para la recogida de semen en caballos por la utilización de vagina artificial, al ser este un método que la mayoría de los sementales aceptan, permite obtener un eyaculado de calidad. No obstante, en algunos casos particulares deberá emplearse otros métodos

alternativos para la obtención de muestra seminales en equinos, realizando una breve descripción de los casos en los que está indicado su uso, el material y métodos necesarios y las características del eyaculado obtenido” (p.1)

Son varios los métodos de evaluación de eyaculado seminal que se han utilizado a nivel mundial, y que han intentado obtener valores más precisos o específicos de la evaluación seminal, dando pie a mejorar las técnicas existentes o crear algunas más novedosas rápidas y eficientes, como el examen de aptitud reproductiva el cual es esencial para predecir la capacidad reproductiva del semental.

La evaluación o examen espermático “es una de las prácticas de laboratorio que se pueden usar para estimar esta capacidad en los animales, debido a la alta frecuencia de células morfológicamente anormales o la alta incidencia de un solo defecto puede reducir la fertilidad de los animales además de evaluar el semen en caballos padrotes in vivo, se realizan técnicas evaluativas post conservación, sea con diluyentes o crioprotectores; por ejemplo, la composición de los diluyentes para la crio preservación del semen equino es determinante en la crio tolerancia y la capacidad fecundante pos descongelación de las células espermáticas”. (Consuegra, 2019., p.21)

Otro método de evaluación de eyaculado seminal, es la vitrificación de esperma, es un método reciente de crio preservación, basado en la bajada de temperatura a alta velocidad introduciendo el esperma del equino directamente en nitrógeno líquido, reduciendo la formación de grandes cristales de hielo, como ocurre en la congelación lenta tradicional.

De esta manera, se puede observar que “la crio preservación de esperma equino se ha realizado tradicionalmente mediante métodos de congelación lenta, con el uso de crioprotectores penetrantes

siendo el glicerol el más utilizado en los últimos 50 años para la congelación de esperma equino”. (Hoffman y col., 2011).

Este método de vitrificación de esperma – de crio preservación de esperma equino al inseminar con esperma congelado con glicerol, se observa un efecto irritante en el tracto reproductor de los equinos, inflamándose las paredes de cuerpo y cuernos uterinos, además de producirse un acumulo de líquido en el cuerpo uterino, si bien los resultados de experiencias previas son contradictorios se ha visto que la inflamación aguda que ocurre de forma fisiológica tras la inseminación es independiente del diluyente crio protector empleado”. (Katila, 2012.,p.11).

Por último, el método de post-descongelación de espermatozoides en inseminación artificial permite recuperar una población espermática contaminada, y poder observar las condiciones óptimas de concepción, los resultados que se obtiene permite recuperar espermatozoides de diferente calidad funcional en semen congelado-descongelado de equino presentándose diferencias individuales con respecto a los métodos. “(Cabrera, 2014., p.7)

➤ ***Tercer Capítulo. Determinar las Condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad.***

La alternativa farmacológica veterinaria debe considerarse una opción para el tratamiento adecuado por contaminación bacteriana en el manejo por eyaculado equino, es importante para esta investigación describir el estudio realizado por las autoras Capurro & Olaso, (2016), estudio en cual se recoge un material científico muy importante para tenerlo en cuenta en este capítulo, de tal manera

vale la pena estudiar los fármacos más importantes que ayudan a contrarrestar microorganismo detectados por el método de evaluación de eyaculado equino, de tal manera que:

[...] “la xilacina, es un agonista alfa 2 adrenérgico comúnmente usado para provocar sedación y analgesia en caballos contaminados por bacterias seminales. Trabajos realizados con esta droga revelaron una tasa de éxito de 27% en inducir la eyaculación ex copula en equinos. También es utilizada clínicamente para inducir la eyaculación en caballos con problemas reproductivos que impide el acto copulatorio, de esta manera los protocolos farmacológicos reportados logran que la eyaculación ex copula en equinos incluya una variedad de dosis, horarios, vías de administración, combinación de drogas” (p.21).

De igual forma las autoras concluyen que “ la Xilacina a una dosis de 0,66 mg/kg i/v tiene una tasa de éxito de 27% y n=28, en comparación con las: imipramina a una dosis de 2 mg/kg i/v con una tasa de éxito de 42% y n=5, la imipramina + xilacina a una dosis de 2 mg/kg de imipramina i/v seguido por 0,3 mg/kg de xilacina i/v luego de 10 minutos mostrando un éxito de 53% y n=5, la imipramina + xilacina a una dosis 0,75 a 2,0 mg/kg de imipramina oral seguido luego de 1 a 3 horas por 0,3 mg/kg de xilacina i/v con una tasa de éxito 68% y n=8, Se ha comparado con información de estudios con prostaglandina F2alfa a dosis de 0,01 a 0,15 mg/kg i/m con una tasa de éxito de 75% y n=8”(Capurro & Olaso, 2016., p.12)

De acuerdo con McDonnell (2001), menciona que:

[...] “las características de cada eyaculado equino varían significativamente entre los distintos protocolos farmacológicos, aparentemente asociado a la variable excitación o inhibición del músculo liso de las glándulas accesorias, el semen obtenido usando solamente xilacina, muestra un volumen, concentración, pH y número total de espermatozoides similar al eyaculado obtenido por monta natural, en este protocolo, los resultados muestran que el éxito del método por eyaculado equino dependió del manejo de la vagina artificial y el nivel de excitación al momento del tratamiento, la mayoría de las eyaculaciones ocurrieron dentro de los primeros 3 minutos de la administración de la misma, al comienzo de la sedación o entre los 15 y 25 minutos, a medida que el animal iba saliendo del plano” (p.23)

De esta forma, el fármaco imipramina o detomidina parecen inhibir las contracciones de las glándulas accesorias resultando en eyaculados de poco volumen, alta concentración espermática, mayor número total de espermatozoides y pH más bajo que los eyaculados obtenidos por monta natural.” (McDonnell et cold,1994)

[...] “los tratamientos realizados con prostaglandina F2alfa parecen promover las contracciones de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de mayor volumen, menor concentración espermática, número total de espermatozoides similar al obtenido por monta natural, cantidades significativas de gel y un pH más alto. Con prostaglandina F2alfala eyaculación ocurre generalmente entre 10 a 50 minutos luego de la administración intramuscular. Se observaron importantes efectos no deseados como ser, sudoración, calambres abdominales y goteo de orina. Estos generan un

desafío desde el punto de vista práctico al momento de obtener una muestra libre de contaminantes como la orina, transpiración, detritos y microorganismos (p.31).

Consideraciones finales y resultados.

En conclusión, los tres capítulos analizados cumplieron con la finalidad de dar respuesta a cada uno de los objetivos y categorías planteadas en esta investigación, se pudo determinar a través de la matriz de autores de los diferentes estudios a nivel Internacional y nacional, que los parámetros seminales del crecimiento bacteriano del método artificial por Eyaculado del equino muestra un resultado con una alta probabilidad de contaminar el semen de los equinos con microorganismo en el proceso de recogida mediante vagina artificial facilitando la proliferación de bacterias en el prepucio y en la uretra de los machos, que hace que crezca una flora mixta con predominio de bacterias saprofitas como E. coli, Streptococcus, entre otras, ante este resultado, la alternativa farmacológica veterinaria cumple un papel muy importante como opción para el tratamiento del crecimiento bacteriano.

- **6. Metodología.**

La metodología que se describe a continuación permite desarrollar los objetivos del presente estudio, a través de una revisión descriptiva de estudios y conceptos, cuya función fue informar de forma argumentativa sobre la temática en particular sobre la Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano del Eyaculado del Equino. Teniendo en cuenta que una monografía es un texto informativo y crítico donde se organizan datos sobre un tema, después de revisar diferentes fuentes bibliográficas”. (Centro de Investigaciones y Tecnologías de Tecnar, 2010)

Esta monografía se fundamentó en el 100% de fuentes secundarias como: consultas a través de internet de artículos científicos indexados, estudios, investigaciones, folletos, enciclopedias, libros de primer nivel, registros y estadísticas referente al tema a relatar.

En este contexto, el propósito de la presente revisión descriptiva del estado de arte, se concibió en una argumentación de los principales autores que expresaron la importancia de los contextos innovadores, y que se realizaron siguiendo las tres (3) fases Metodológicas, como: 1. **Recopilación de información**, la cual permitió conocer y analizar el objetivo principal de esta monografía, a través de fuentes secundarias en consultas de internet, libros de primer nivel y artículos científicos indexados. 2. **Clasificación de la información**; que sirvió para categorizar o estructurar datos en orden de importancia o relevancia. Generalmente la clasificación se realizó según la criticidad de los documentos o según su importancia de la información, y 3. **Análisis acerca de los tres temas**

clasificados y desarrollo de los objetivos, los cuales son imprescindibles, puesto que indicaron lo que se esperaba de este trabajo monográfico y definir la forma en que se alcanzará el resultado.

○ **6.1. Tipo de Estudio.**

Se realizó un estudio descriptivo, Revisión bibliográfica. Monografía de compilación.

○ **6.2. Población de estudio**

Se realizó estudios e investigaciones a nivel nacional e internacional, sobre la Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano del Eyaculado del Equino.

○

○ **6.3. Muestra**

El estado de arte concibió con la argumentación de los principales autores a nivel internacional y nacional, que expresaron la importancia de los estudios dirigidos hacia el crecimiento bacteriano del eyaculado equino, estos estudios permitieron metodológicamente visualizar la evaluación los parámetros seminales y el crecimiento bacteriano del eyaculado en el equino, y los tratamientos farmacológicos como compuestos químicos que se utilizan para curar, detener o prevenir esta patología.

○

○ **6.4. Fases metodológicas aplicadas**

Fase I. Recopilación de información: La cual permitió conocer y analizar el objetivo principal de la monografía a través de fuentes secundarias como: Consultas de internet en buscadores conocidos, libros, de primer nivel, artículos científicos en revistas indexadas, estudios e

investigaciones, folletos, enciclopedias y estadísticas referente al tema de Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad.

Fase II. Clasificación de la Información: Donde se categorizó y estructuró los datos de orden de importancia como: 1. Identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del eyaculado en los equinos para determinar la clase de microorganismos presentados. 2. Analizar los métodos de evaluación seminal que se han implementado en diferentes estudios a nivel internacional y nacional para determinar las características y funcionalidades. 3. Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad.

Fase III. Análisis de los tres temas clasificados en el desarrollo de los objetivos. Se desarrolló cada objetivo para determinar el alcance y el resultado de la información.

○ **6.5. Criterios Metodológicos**

▪ **6.5.1. Criterios de Inclusión**

Estudios e investigaciones de autores de primer nivel sobre la descripción de los parámetros seminales y el crecimiento bacteriano del eyaculado en el equino para conocer los métodos de identificación de los microorganismos.

- Estudios e investigaciones enfocados al tema de descripción de parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano con el Método Reproductivo Artificial Eyaculado del Equino.
- Artículos publicados en Europa, Latino América y Colombia en revistas indexadas entre los años del 2010 al 2019.

- Idioma español, en bases de datos de acceso libre.

▪ **6.5.2. Criterios de exclusión**

- Información incompleta en boletines, folletos sin sustentación de referencia bibliográfica.
- Páginas de blog y Wikipedia sin autores de primer nivel.
- Artículos que requieran pago por acceso.
- Estudios que no hicieron referencia al tema principal de estudio sobre los parámetros seminales y el crecimiento bacteriano del eyaculado en el equino para conocer los métodos de identificación de los microorganismos.
- Artículos e investigaciones consultadas antes del 2010.

● 7. Discusión

Dentro de los parámetros seminales del crecimiento bacteriano del método artificial de reproducción Eyaculado del equino, se encontró que “algunos microorganismos que alteran las condiciones óptimas para que sobreviva el espermatozoide.” (Sánchez, 2011., p.23); En este contexto, se puede observar que los estudios descritos dejaron ver efectivamente “la forma severa de como el crecimiento bacteriano del equino, disminuyen la viabilidad de las células espermáticas a través de mecanismos asociados a la apoptosis, como la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de caspasas por método de eyaculado equino”. (Usuga, 2017., p.26).

Los autores evidencian que “muchos de los equinos eyaculados artificialmente sanos se encontraron contaminados con microorganismos como son *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (coagulasa-negativos) y de la clase Actino bacteria y una baja de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, de los géneros *Micrococos*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Streptococcus* (alfa-hemolíticos) y de las *Streptococcus* (alfa-hemolíticos) y de las *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus equino*, los cuales podría esperarse que provengan de la mucosa del prepucio y la uretra”. (Kristula et. Cold, 2011., p.11). En este sentido, se hace necesario una evaluación reproductiva a los sementales con método de eyaculado antes del inicio de la temporada reproductiva con el fin de prevenir eventuales problemas y evitar pérdidas productivas significativas y de esta manera poder determinar el origen del desorden y establecer un pronóstico para evaluar las opciones de tratamiento a los fines de intentar el retorno a la fertilidad” Rodriguez et cold, (2018). Es así que los parámetros seminales juegan un papel muy importante porque “ayudan a comprender la morfología del semen de los equinos a través del método de Vitriificación

de espermatozoos de caballo empleando crioprotectores no penetrantes, los cuales disminuyen el riesgo de transmisión de infecciones virales y bacterianas en los equinos” (González et al., 2016). De igual forma la Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen en equinos para los procesos de conservación muestran crecimiento de microorganismos en los equinos machos, “la optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal equino, específicamente a través de la técnica de selección espermática de centrifugación coloidal incrementa el éxito obtenido con ella”. Gutiérrez, (2014).

Referente a las técnicas que no han sido vistas apropiadas para el manejo apropiado del espermatozoide como los es “la Activación del Receptores u opioides porque el uso de semen refrigerado pasadas las 24-48 horas disminuyendo considerablemente su eficiencia en términos de fertilidad, de esta manera se ha tenido en cuenta utilizar diluyentes de refrigeración que mantengan intacta la calidad seminal”. (Vallejos, 2011., p.8).

Por tanto, los métodos de evaluación seminal como “la crioterapia permite estudiar la macrobiótica seminal permitiendo un abordaje más adecuado en relación a las predicciones del genotipo, la selección de rasgos y nuevos referentes a una eficaz reproducción equina de mayor calidad”.(Castro et al.,2019, p.19).

Los estudios muestran que las ayudas diagnósticas son eficaces para analizar “, los parámetros de motilidad, vigor, morfología e integridad de membrana plasmática para cada uno de los crioprotectores a través de la técnica efecto del medio extensor usada para el congelamiento en la célula espermática del equino muestra efectos benéficos en los parámetros espermáticos pos descongelamiento de forma independiente al crioprotector utilizado en los caballos criollos colombianos”. (Pérez, 2018., p.32).

Al estudiar los factores etiopatogénicos del semen del equino conlleva a que haya un manejo profesional de tratamientos farmacológicos que solo debe ser asumida por los médicos veterinarios, “el tratamiento con imipramina y detomidina, aumenta las contracciones de las ampollas del conducto deferente e inhibe la de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de menor volumen, mayor concentración espermática, menor pH y mayor número total de espermatozoides que una eyaculada in copula. Por otro lado, el tratamiento con prostaglandina F2alfa parece aumentar las contracciones de las glándulas accesorias resultando en eyaculados de gran volumen, mucho gel, baja concentración, pH aumentado y número total de espermatozoides similar a la obtenida in copula”. (Pérez., 2017, p.11). Similarmente “el uso de preparaciones antibióticas con penicilina, estreptomina y anfotericina B en la crio preservación de semen equino reduce la proliferación de bacterias, pero produce una disminución en la movilidad espermática pos descongelación”. (Restrepo 2016, p.9).

-

- **8. Conclusiones**

Dando cumplimiento con los objetivos planteados en la presente monografía se establecen las siguientes conclusiones:

Los problemas relacionados con el crecimiento bacteriano del método de reproducción artificial Eyaculado del equino pueden alterar las condiciones óptimas para que sobreviva el espermatozoide equino como lo han demostrado las pruebas del laboratorio por descongelado, esto puede darse por desconocimiento de los parámetros del método en el momento que se va a utilizar la vagina artificial y por falta de personal capacitado.

Cabe señalar que, *la inseminación artificial, es una técnica efectiva para optimizar la utilización de los sementales en los programas de reproducción*; es por esto, “que cuando son utilizados de manera correcta los procedimientos de inseminación artificial y de manejo de semen, se logran alcanzar muy buenas tasas de preñes, las cuales actualmente logran algunas veces ser mayores que utilizando el cubrimiento natural, tanto en reproductores como en yeguas con fertilidad marginal” (Brinsko, 2011).

El método de Eyaculado equino es bueno en los programas de reproducción con semen congelado, “determina mayor eficiencia del uso del semen, sin comprometer las tasas de preñes, teniendo en cuenta que las técnicas utilizadas tengan un balance costo-efectividad”. (Metcalf, 2007).

Las técnicas utilizadas en el método de Eyaculado equino deben ser integradas de una manera adecuada, ya que muchas veces los fracasos en este tipo de técnicas pueden deberse al desconocimiento tanto de estas como de otros factores importantes que influyen directamente en la reproducción equina, si no se presenta un equilibrio entre estos factores, tarde que temprano se verá comprometida la tasa de preñes y la reproducción en general.

La práctica de la inseminación artificial con semen congelado, se logra establecer que mediante el procesamiento en el laboratorio se puede tener dosis más concentradas de espermatozoides las cuales van a lograr brindar unos mejores resultados, ya que complementados con los medios diluyentes que traen antibióticos y sustancias enriquecedoras las cuales prolongan la vida del espermatozoide y automáticamente aumentan la posibilidad de obtener una tasa más alta de preñes, haciendo mucho más efectiva la labor del Médico veterinario, algunos estudios presentados indicaron que la mayoría de ellos carecen de mediciones sistemáticas continuas que es donde se encuentra el margen de error en el crecimiento bacteriano en el proceso de la técnica.

Concluyendo, es importante ampliar y organizar los conceptos generales sobre el método Eyaculado equino y su incidencia en el crecimiento bacteriano, para que los resultados se logren se debe actualizar las bases bibliográficas de medicina veterinaria en la universidad Antonio Nariño (UAN), permitiendo no solo su consulta, sino la promoción de investigaciones que profundicen el análisis científico a los estudiantes del programa de Medicina Veterinaria.

- **9. Recomendaciones**

De acuerdo a los parámetros seminales y análisis del crecimiento bacteriano del eyaculado del equino, a los objetivos trazados y las categorías analizadas para esta investigación, se recomienda que:

Para identificar las particularidades del crecimiento bacteriano del eyaculado en los equinos y la clase de microorganismos, se recomienda realizar una evaluación constante al método reproductivo por Eyaculado equino, antes del inicio y durante la cubrición con el fin de prevenir eventuales problemas como el crecimiento de bacterias en el uso de la vagina artificial. Se recomienda la actualización científica de estudios a través de la universidad para poder contar con diagnósticos y tratamiento encaminados hacia procesos de conservación seminal, a través de técnicas de selección espermática que permitan dar un diagnóstico oportuno para el tratamiento y protocolos de manejo.

Para poder analizar los métodos de evaluación seminal y determinar las características funcionales, se recomienda implementar parámetros para la identificación de microorganismos en el método por eyaculado equino, como son la Activación del Receptores, utilizando diluyentes de refrigeración para mantener intacta la calidad seminal, se recomienda la crioterapia porque va permitir estudiar la macrobiótica seminal permitiendo tener un abordaje más adecuado en relación a las predicciones del genotipo de la bacteria, se recomienda los Crio protectores a través de la técnica efecto del medio extensor usada para el congelamiento en la célula espermática del equino muestra efectos benéficos en los parámetros espermáticos pos descongelamiento de forma

independiente al crioprotector utilizado como lo evidencian los estudios. La vitrificación es igualmente un método alternativo a la criopreservación convencional que permite que la solución pase a un estado vítreo, evitando el daño de la congelación tradicional, la vitrificación de espermatozoides es un método de criopreservación ultra rápida que consiste en la exposición directa a nitrógeno líquido.

Determinar las condiciones y tratamientos adecuados para una eficaz reproducción equina de mayor calidad; Se recomienda el uso de tratamientos farmacológicos que solo debe ser asumida por los médicos veterinarios, como es el tratamiento con imipramina y detomidina, que “aumenta las contracciones de las ampollas del conducto deferente e inhibe la de las glándulas accesorias, resultando en eyaculados de menor volumen, mayor concentración espermática, menor pH y mayor número total de espermatozoides que una eyaculada in copula” (Pérez.,2017, p.11).

Se recomienda, el uso de fármacos bajo manejo del profesional de veterinario para el tratamiento con prostaglandina F2 alfa la cual aumenta las contracciones de las glándulas accesorias resultando en eyaculados de gran volumen, mucho gel, baja concentración, pH aumentado y número total de espermatozoides similar a la obtenida in copula.

● Bibliografía

- Anguiano, Rubén et cold. (2018). Estudios bacterianos sobre vesiculitis equina. México
- Bielanski A. (2007). Procedimientos de desinfección para el control de microorganismos en el semen y embriones de humanos y animales de granja. p. 68, 1-22.
- Capurro & Olaso, (2016). Inducción farmacológica de la eyaculación ex copula en caballos holsteiner en entrenamiento. Universidad de la republica facultad de veterinaria. Uruguay
- Caro, R.; Gutiérrez, L. (1999). Prevención de enfermedades infecciosas en equinos. (En Línea). Buenos Aires, AR. Consultado 28 mar. 2014.
- Cabrera, P et cold, (2014). Selección Espermática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmática, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial
- Castro & González (2019). Métodos modernos de Evaluación Seminal en Equinos. Modern, Methods Of Seminal Evaluation in Equine. Universidad Cooperativa de Colombia. Facultad de Ciencias de la Salud. Medicina Veterinaria y Zootecnia Villavicencio. Recuperado en línea de: 2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf (ucc.edu.co). Colombia
- Caiza de la Cueva, F.I., Rigaud, T., Bonet, S., Miró, J., Eriz, M., Rodríguez-Gil, J.E. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of Ouabain. *Theriogenology*. 47:765, (1997).
- Cictar. Centro de Investigaciones y Tecnologías de Tecnar. (2010). Recuperado de: file:///C:/Users/Personal/Downloads/Estructura%20Para%20Realizaci%C3%B3n%20De%20Monograf%C3%ADa.pdf

Clavijo, B (2015). Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de crio preservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años- Ecuador. Disponible en: 120505.pdf (usfq.edu.ec). Quito

- Consuegra, (2019). Métodos de recogida de esperma en caballos. Vitrificación.

Brinsko SP, Varner DD, Blanchard TL (1991). El efecto del lavado uterino realizado cuatro horas después de la inseminación sobre la tasa de preñez en yeguas. p.35

Díaz, N (2010). Características del eyaculado equino y variaciones estacionales. Revisión bibliográfica. Cuba.

González C. (2016). Vitrificación de esperma de caballo empleando crio protectores no penetrantes. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Grupo de Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba. España

González, M (2017). Efecto de la crio preservación en Espermatozoides obtenidos de cola de Epidídimo Equino a diferentes tiempos Post – Mortem. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México

Gutiérrez, L. (2014). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina Cirugía Animal. Recuperado de: T35236.pdf (ucm.es). Madrid – España

Giovanni Restrepo Betancur¹ et col, Leonardo Rodríguez Mazo, Juan Esteban Duque Cortés, (2016) “Proliferación Microbiana y Calidad Pos descongelación de Semen Equino Crio preservado en Presencia de Antibióticos

Hoffmann, N (2011). concentrations of cry protective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing." *Anim Reprod Sci* 125(1-4): 112-118.

Heyne, E. (1979) Variaciones mensuales de algunas características del semen del potro Tesis. Fac. de Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Hernández, Fernández, (2015). Estudio Evaluación de la contaminación bacteriana del semen de moruecos recogido mediante vagina artificial - Bacterial contamination assessment from ram semen obtained by artificial vagina. Hernández Valero, Mercedes¹ Fernández Casasnovas, Antonio. p.78

Hugges, Asbury, Loy y Burd, 1967; Salisbury y Willett (1941). Estudios sobre procesos de flora alterada por contaminante y procesos inflamatorios en el tracto genital en la yegua. Estados unidos.

Sánchez, A. (2011). Evaluación del efecto de tres diluyentes, plasma seminal y tiempo de refrigeración en la sobrevida espermática en semen de potro. Tesis. Fac de Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago Chile.

Seminario, J (2020). "Efecto citotóxico del ácido hipocloroso en espermatozoides de caballo equus caballus. Universidad Ricardo palma facultad de ciencias biológicas escuela profesional de medicina veterinaria. Perú.

Pérez, Sampallo, J. (1980) Nuevas técnicas en el estudio del semen de potro. Cito química cuantitativa de proteínas y microscopía electrónica de barrido. Tesis Magister. Fac. de Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Ramirez 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):

Rodriguez L, B & Fumoso (2018). Azoospermia, como causa de infertilidad en padrillo. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Recuperado de: Rodriguez, Luciana patricia.pdf (unicen.edu.ar). Tandil

Restrepo, L & Duque J. (2016). Proliferación Microbiana y Calidad Pos descongelación de Semen Equino Crio preservado en Presencia de Antibióticos. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Recuperado en: a14v27n2.pdf (scielo.org.pe)

Reed, S M., W M. Bayly y D C. Sellon. (2005). Medicina interna equina. 2nd ed. Vol. 1. Buenos Aires: Intermedica, 2005. 890-900 pp. Print. 2 Vols.

Restrepo G, & Velásquez, A. (2013). Evaluación de la Movilidad del Semen Crio preservado de Caballos Criollo Colombiano por un Sistema Analizador de Clase. Artículo Científico. Facultad de Ciencias Agrarias Politécnico Colombiano. Recuperado de: Revista2_2013.indb (scielo.org.co). Colombia

Restrepo, & Rojano (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Artículo de revisión. Recuperado de: Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino.(Techniques for analyzing thê potential fertility of stallion semen) (Métodos de avaliação do potencial de fertilidade do semen equino) | CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. Medellín – Colombia.

Rodriguez, (2015). Determinación molecular de *Leptospira* spp. en semen y líquido preseminal y estudio serológico de caballos criollos en el departamento de caballos criollos en el departamento de. Colombia

Kristula, & Smith B. (2004). Diagnóstico y tratamiento de cuatro sementales, portadores del organismo metritis contagiosa - Reporte de caso. *Theriogenology* 61: 595-601. Doi: 10.1016 / S0093- 691X (03) 00228-0

Ortega, F C (2011). Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano del Eyaculado del Equino. España – Cáceres

Ortega, C (2011). Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino. Estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. Universidad de Extremadura. España

Palomares, (2005). Aislamiento y caracterización de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) en muestras de semen de carneros con epididimitis. *Investigación de pequeños rumiantes*. p 60 (3), 221-225. Palomares, G.; Aguilar, F.; Hernández; L., Acosta, J.; Herrera, E.; Tenorio, V.

Pérez J. (2018). Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos. *Revista Colombiana de Ciencias Animal Recia*. Colombia.

Pérez & Restrepo (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia 2 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Medellín, Colombia.

Perez Sampallo, J. (1980) Nuevas técnicas en el estudio del semen de potro. Cito química cuantitativa de proteínas y microscopía electrónica de barrido. Tesis Magister. Fac. de Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Santamaría V., Araceli A. (2002). "Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal."

Rev Cent Santamaría V., Araceli. "Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal."

- McDonnell S.M, Garcia M.C, Kenney R.M (1987). Pharmacological manipulation of sexual Behaviour in stallions, *Journal of Reproduction and Fertility*. 35: 45-49.
- Muñoz D, & Martínez, F (2013). Diluyentes de Semen Equino para su uso Fresco y refrigerado por 24 y 48 Horas: Comparación entre leche descremada Uht y un diluyente comercial Equipro Tm). Disponible en Microsoft Word - Tesis De Grado. Docx (Fvet.Edu.Uy) Uruguay.
- Muñoz & Palomar (2015), Técnicas empleadas para aumentar la calidad seminal en los caballos
- Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodríguez Martinez H. (2009). Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim Reprod Sci* 116: 119-128. Estados Unidos
- Losinno L. 2007. Avances en la Aplicación de biotecnologías reproductivas en equinos, *Proceeding del VII simposio internacional de reproducción animal-IRAC*. p. 157-164.
- Loomis P.R. (2001). La industria del semen congelado equino, *Animal Reproduction Science* 68, 2001; pp. 191-200.
- Katila, T. (2012). "Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus." *Reproduction in Domestic Animals* 47(SUPPL. 5): 31-41.
- Varner, D.D., et al. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *En: Theriogenolgy*. Vol. 50 (1998); p.109-573.
- Vallejos, A (2011). Efecto de la Activación del Receptor μ -opioide en la Longevidad y Calidad Espermática de Equinos post Descongelación, en Eyaculados y Células Espermáticas Epididimarias. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinaria. Instituto de Ciencia Animal. Recuperado de: Untitled (uach.cl) Chile

Villegas J, Schütz M, Soto L, Sánchez R. (2005). Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis* 10: 105-110. Doi: 10.1007.

Usuga. A, (2017). Plasma seminal en el caballo criollo colombiano y su relación con la calidad de semen crio preservado. Colombia

Usuga, A & Madriz, A. (2018). Evaluación de marcadores moleculares y su relación con la congelabilidad del semen equino”. Médica Veterinaria Zootecnista Universidad CES, Docente facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Recuperado de: [Evaluacion_marcadores_moleculares \(1\).pdf \(ces.edu.co\)](#). Colombia

●

- Anexo A

Matriz de Referencias Bibliográfica por orden cronológico

Año	Nombre	Título	País
2019	Castro y González	<i>Métodos modernos de Evaluación Seminal en Equinos.</i> <i>Modern ,Methods Of Seminal Evaluation in Equine.</i> Universidad Cooperativa de Colombia. Facultad de Ciencias de la Salud. Medicina Veterinaria y Zootecnia Villavicencio. Recuperado en línea de: 2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf (ucc.edu.co)	Colombia
2018	Rodriguez L, Bárbara A y Fumuso	<i>Azoospermia, como causa de infertilidad en padrillo.</i> Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Recuperado de: Rodriguez, luciana patricia.pdf (unicen.edu.ar)	Tandil
2018	Pérez J.	<i>Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos.</i> Revista Colombiana de Ciencias Animal Recia.	Colombia
2018	Usuga A y Madriz A.	<i>“Evaluación de marcadores moleculares y su relación con la congelabilidad del semen equino”.</i> Médica Veterinaria Zootecnista Universidad CES, Docente facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Recuperado de: Evaluacion_marcadores_moleculares (1).pdf (ces.edu.co)	Colombia

2017	Pérez D, Acosta L y Restrepo	<i>Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida.</i> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia 2 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Medellín, Colombia. Recuperado de:	Colombia
2017	González M.	<i>Efecto de la criopreservación en Espermatozoides obtenidos de cola de Epidídimo Equino a diferente tiempos Post – Mortem. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco División de Ciencias Biológicas y de la Salud.</i>	México
2016	Restrepo, Rodríguez L y Duque J.	<i>Proliferación Microbiana y Calidad Posdescongelación de Semen Equino Criopreservado en Presencia de Antibióticos.</i> Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Recuperado en: a14v27n2.pdf (scielo.org.pe)	Colombia Medellin
2016	González C.	<i>Vitrificación de esperma de caballo empleando crioprotectores no penetrantes.</i> Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Grupo de Reproducción Animal. Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba.	España
2015	Clavijo Berrera	Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años- Ecuador. Disponible en: 120505.pdf (usfq.edu.ec)	Quito

2014	Gutierrez, L	Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de medicina cirugía animal. Recuperado de: t35236.pdf (ucm.es)	Madrid - España
2013	Restrepo G, Ocampo D y Velásquez A.	Evaluación de la Movilidad del Semen Criopreservado de Caballos Criollo Colombiano por un Sistema Analizador de Clase. Artículo Científico. Facultad de Ciencias Agrarias Politécnico Colombiano. Recuperado de: Revista2_2013.indb (scielo.org.co)	Colombia Medellín
2013	Restrepo G, Usuga A y Rojano	Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Artículo de revisión. Recuperado de: Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino.(Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen) (Métodos de avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino) CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.	Colombia Medellín.
2013	Muñoz D, Martínez, F	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 tm). Disponible en microsoft word - tesis de grado.docx (fvet.edu.uy)	Uruguay
2011	Ortega Ferrusola C	Descripción de los Parámetros Seminales y Análisis del Crecimiento Bacteriano del Eyaculado del Equino	España – Cáceres.

2011	Ortega C	Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino. Estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. Universidad de Extremadura.	España
2011	Vallejos A	Efecto de la Activación del Receptor μ -opioide en la Longevidad y Calidad Espermática de Equinos post Descongelación, en Eyaculados y Células Espermáticas Epididimarias. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinaria. Instituto de Ciencia Animal. Recuperado de: Untitled (uach.cl)	Chile
2013	Restrepo G	<i>Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino.</i> Revista CES. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Volumen 8 No. 1. Recuperado de: Redalyc.Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino	Colombia Medellín