

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Informe de Trabajo Final presentado para optar al
Grado de Médica Veterinaria

Modalidad: Ensayo experimental

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES
DILUYENTES EN LA CALIDAD DEL SEMEN EQUINO
FRESCO Y REFRIGERADO

Alumna: María Florencia Rebaque
36222056

Director: Luis Losinno, MV, PhD.

Colaboradores: Juan J. Busso, MV.
Claudia Ledesma, Ing, MSc.
Facundo Bonino, Ing.
Rolando Quinteros, Ing.

Río Cuarto – Córdoba
Octubre/2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

Autor:

DNI:

Director:

Co-Director:

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
Comisión Evaluadora:

(Nombres)

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

DEDICATORIA

A quienes incentivan y participan en la construcción del conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A Luis Losinno, Juan J. Busso, Claudia Ledesma, Facundo Bonino, Rolando Quinteros, Mariana Benavent, Analía Chanique, Laura Ramírez y a todos los integrantes del Laboratorio de Producción Equina de la UNRC.

A mi familia.

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE	III
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO	3
MARCO TEÓRICO	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
1. DISEÑO	7
2. LUGAR Y TIEMPO	7
3. ANIMALES	7
4. PROCEDIMIENTO	7
<i>Tabla 1: Composición de los diluyentes utilizados en el ensayo.....</i>	<i>8</i>
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
<i>Fig. 1. Esquema de un diagrama de caja.</i>	<i>10</i>
RESULTADOS.....	13
1. MOTILIDAD PROGRESIVA.....	13
<i>Fig. 2. Valores de motilidad progresiva en cero horas.</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 2: ANOVA de motilidad progresiva en cero horas.....</i>	<i>13</i>
<i>Fig. 3. Comparación múltiple de medias de motilidad progresiva en cero horas.....</i>	<i>14</i>
<i>Fig. 4. Valores de motilidad progresiva en 0,5 horas y a 24°C.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla 3: ANOVA de motilidad progresiva en 0,5 horas y a 24°C.....</i>	<i>15</i>
<i>Fig. 5. Valores de motilidad progresiva en 12 horas y a 24°C.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 4: ANOVA de motilidad progresiva en 12 horas y a 24°C.....</i>	<i>16</i>
<i>Fig. 6. Valores de motilidad progresiva en 12 horas y a 4°C.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 5: ANOVA de motilidad progresiva en 12 horas y a 4°C.....</i>	<i>17</i>
<i>Fig. 7. Valores de motilidad progresiva en 24 horas y a 4°C.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 6: ANOVA de motilidad progresiva en 24 horas y a 4°C.....</i>	<i>18</i>
2. CRECIMIENTO BACTERIANO.....	18
<i>Fig. 8. Valores de UFC/ml en cero horas.</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 7: ANOVA de concentración de UFC/ml en cero horas.</i>	<i>19</i>
<i>Fig. 9. Comparación múltiple de medias de crecimiento bacteriano en cero horas.</i>	<i>20</i>
<i>Fig. 10. Valores de UFC/ml para el semen crudo a cero horas y el semen diluido a 0,5 horas.</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 8: ANOVA de concentración de UFC/ml para semen crudo a cero horas y Kenney y Equiplus® a 0,5 horas.....</i>	<i>21</i>
<i>Fig. 11. Comparación múltiple de medias de crecimiento bacteriano para semen crudo a cero horas y Kenney y Equiplus® a 0,5 horas.</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 12. Valores de UFC/ml en 24 horas y a 4°C.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 9: ANOVA de concentración de UFC/ml en 24 horas y a 4°C.....</i>	<i>23</i>
<i>Fig. 13. Comparación múltiple de medias de crecimiento bacteriano en 24 horas y a 4°C.....</i>	<i>24</i>

DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
ANEXO I.....	31
ANEXO II.....	32

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar y comparar el efecto de un diluyente comercial con proteínas definidas de la leche, con otro diluyente preparado en base a leche descremada, ambos con diferente composición de antibióticos. Para ello se diseñó y llevó a cabo un ensayo experimental.

Se colectaron nueve eyaculados a un padrillo, y el semen fue fraccionado y diluido en Equiplus® y en diluyente de Kenney con ticarcilina-clavulánico. Se almacenó a 4°C y a 24°C midiendo diferentes variables indicativas de calidad espermática y microbiológica del semen inmediatamente después de efectuar la dilución, a los 30 minutos, 12 y 24 horas.

Para el análisis estadístico se tuvieron en cuenta las variables de motilidad progresiva (%) y concentración de UFC/ml. No se registraron diferencias significativas entre los valores de motilidad progresiva al comparar el diluyente de Kenney con Equiplus® para ninguno de los tiempos y temperaturas de conservación probados en este ensayo. En cuanto a los parámetros microbiológicos se pudo apreciar un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano significativo inmediatamente después de la adición del diluyente de Kenney con ticarcilina-clavulánico, y a los 30 minutos fue evidente la acción antibacteriana de ambos diluyentes con respecto a la concentración de bacterias presentes en el semen crudo inicialmente.

EVALUATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT EXTENDERS IN FRESH AND COOLED STORED EQUINE SEMEN

SUMMARY

This study was conducted to evaluate and compare the effect of a commercial defined milk protein extender with a skim milk based extender, both containing different antibiotic combination. A field trial was designed and performed.

Nine ejaculates were obtained from one stallion, and semen was split and diluted with Equiplus® and Kenney extender with ticarcilin-clavulanic. Semen was stored at 4°C and 24°C, and different parameters regarding sperm and microbial quality were measured right after semen dilution, 30 minutes, 12 and 24 hours later.

The variables considered for statistical analysis were progressive motility (%) and CFU/ml. There were no statistically significant differences between Equiplus® and Kenney extender for progressive motility in any of the storage temperatures at any of the times tested in this study. In terms of microbiological parameters, a significant inhibition of bacterial growth was observed right after the addition of ticarcilin-clavulanic Kenney extender, and 30 minutes later the antimicrobial action of both extenders was evident given the initial bacterial concentration of raw semen.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas actuales de producción equina es común la aplicación de biotecnologías a la reproducción. Una de las técnicas más ampliamente difundidas es la inseminación artificial, llevada a cabo con semen fresco, refrigerado o congelado (Allen y Antczak, 2000).

La necesidad de obtener semen de buena calidad y de mantenerla en diferentes condiciones fundamenta el uso de diluyentes. La adición de antibióticos a los diluyentes mejoró sustancialmente las tasas de preñez obtenidas debido a la reducción de la contaminación bacteriana del semen por flora normal y posibles patógenos (Bowen, 2011). Sin embargo, la variabilidad del semen entre individuos determina que el resultado al utilizar un mismo diluyente no sea universal para todos los padrillos.

Hipótesis:

- i. Un diluyente con composición definida preserva significativamente mejor la motilidad progresiva de los espermatozoides en comparación a un diluyente en base a leche descremada durante las primeras 24 horas post dilución en semen refrigerado (4°C)
- ii. Un diluyente con composición definida preserva significativamente mejor la motilidad progresiva de los espermatozoides en comparación a un diluyente en base a leche descremada durante las primeras 12 horas post dilución en semen mantenido a 24°C
- iii. La carga bacteriana inicial del semen disminuye significativamente luego de los primeros 30 minutos de exposición a los antibióticos
- iv. La proliferación bacteriana es significativamente mayor en el semen crudo (sin diluyentes) refrigerado (a 4°C) por 24 horas, que en el semen tratado con un diluyente que contiene antibióticos mantenido en las mismas condiciones

Objetivo:

Evaluar y comparar el efecto de dos diluyentes, con diferente composición y combinación de antibióticos, en el semen de un padrillo considerando parámetros espermáticos y microbiológicos.

MARCO TEÓRICO

La inseminación artificial es una biotecnología reproductiva de alto impacto en programas de mejoramiento genético, dado que incrementa el número de yeguas que puede cubrir un padrillo por monta natural, elimina las restricciones geográficas, obliga a evaluar y monitorear continuamente la calidad del semen, mejora el potencial reproductivo de padrillos sub-fértiles, permite la preñez en yeguas susceptibles a generar endometritis o respuesta inmune postcoital exacerbada, puede contribuir en la prevención de infecciones de transmisión sexual (Tibary *et al.*, 2009; Bowen, 2011), posibilita la criopreservación del semen para ser utilizado mucho tiempo después, compatibiliza la actividad reproductiva de un padrillo con su actividad deportiva, permite incluir como reproductores a padrillos con enfermedades de las glándulas accesorias (McKinnon, 2013), o con lesiones músculo-esqueléticas; entre otras ventajas (Davies Morel, 1999; Conboy, 2011; Dutra Muñoz *et al.*, 2013).

El éxito de la técnica (fecundación del ovocito) depende principalmente de la utilización de semen de alta calidad, determinando parámetros como concentración espermática, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, morfología, respuesta a test de hiposmolaridad (Baumber – Skaife, 2011), aunque existen pruebas más específicas para predecir la fertilidad basadas en determinar el daño en el ADN (Burns y Herickhoff, 2014) y la función mitocondrial de los espermatozoides mediante sondas fluorescentes (Peña *et al.*, 2015).

Para mantener esta calidad inicial del semen, se recomienda el uso de diluyentes (Pickett y Voss, 1975) que preservan la motilidad, integridad de la membrana plasmática, mitocondrias y cromatina de los espermatozoides (Aurich, 2011), previenen el shock térmico por enfriamiento (Katila, 2011), preservan la longevidad de los espermatozoides, neutralizan el efecto detrimental del plasma seminal (Manjunath, 2012), estabilizan el pH – especialmente importante para padrillos con urospermia- (Dietz *et al.*, 2007) y reducen la contaminación bacteriana (Pagl *et al.*, 2006; Dietz *et al.*, 2007; Samper, 2009; Conboy, 2011; Samper, 2011; McKinnon, 2013).

En general, los diluyentes seminales se componen de una fuente de energía utilizable por los espermatozoides, buffers, lipoproteínas (Brinsko *et al.*, 2011), con un rango de osmolaridad de 300 a 350 mOsm/L y pH de 6,8 a 7 (Aurich, 2011). Muchos contienen antibióticos para retardar o inhibir el crecimiento bacteriano, e incluso antifúngicos si se almacenará a más de 10°C (Brinsko *et al.*, 2011).

Los ingredientes base de los diferentes tipos de diluyentes más difundidos actualmente son:

- Sustrato proteico: leche descremada o proteínas presentes en la misma (caseinatos, β lactoglobulina)
- Sustrato energético: lactosa, glucosa, sucrosa, rafinosa
- Buffers: bicarbonato de sodio, citrato de sodio, citrato de potasio, HEPES (ácido piperacinetanosulfónico), tris, glicina
- Antioxidantes: ácido ascórbico, piruvato
- Antimicrobianos: gentamicina, penicilina potásica, penicilina sódica, amikacina, estreptomicina, ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina, timentin, lincomicina, espectinomina, y anfotericina B como antifúngico.

(Davies Morel, 1999; Batellier *et al.*, 2001; Dietz *et al.*, 2007; Samper, 2009; Brinsko *et al.*, 2011; Aurich, 2011; Brinsko 2011 b; Conboy, 2011; Dean *et al.*, 2012).

La motilidad espermática puede verse afectada negativamente si no se respetan las concentraciones adecuadas de los componentes del diluyente (Hodder y Lui, 2011).

Dado que la leche es una sustancia biológica, su composición es altamente variable, y no todos sus componentes son beneficiosos para los espermatozoides. Los fosfocaseinatos, β globulinas y α lactoalbúminas demostraron ser los más efectivos como protectores de los espermatozoides (Batellier *et al.*, 1997; Aurich, 2005; Pagl *et al.*, 2006; Manjunath, 2012). Promueven la capacidad antioxidativa en el semen e impiden la acción de proteínas del plasma seminal que estimulan el eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática, ocasionando la capacitación espermática prematura, lo cual disminuye la fertilidad y longevidad (Aurich, 2011; Manjunath, 2012).

En base a este descubrimiento, se diseñaron diluyentes comerciales de composición definida y constante, como Equiplus® (Minitüb GmbH).

Hay que considerar que la cantidad y el contenido del plasma seminal son variables según el padrillo y en cada eyaculado, por lo cual también tiene relevancia el factor de dilución semen:diluyente en cada caso en particular (Rigby *et al.*, 2001).

Existen muchos protocolos para manipular semen –reduciendo todo lo posible el daño por contacto con el medio- luego de colectarlo, dado que la inseminación puede llevarse a cabo con semen fresco, refrigerado o congelado y posteriormente descongelado.

Uno de los factores críticos al coleccionar y procesar semen, es la contaminación bacteriana. Los microorganismos compiten con las células espermáticas por el sustrato (Burns *et al.*, 1975) y algunas especies de bacterias pueden activar las caspasas

desencadenando la apoptosis en espermatozoides (Ortega Ferrusola *et al.*, 2008; Ramirez Neto *et al.*, 2015). Dado que, en padrillos libres de infecciones de transmisión sexual, las bacterias provienen de la contaminación del semen con flora normal genital – especialmente al colectar utilizando vagina artificial (Aurich, 2005)- la efectividad de la combinación de antibióticos en el diluyente puede presentar variación entre individuos.

En el semen de padrillos clínicamente sanos se han aislado *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus equi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Aerobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Taylorella equigenitalis* y *Acinobacter spp.* (Tibary *et al.*, 2009; Baumber - Skaife, 2011). Ortega Ferrusola *et al.* (2008) hallaron *Rhodococcus spp.* El lavado indiscriminado del pene, o con antisépticos, produce un desbalance microbiano y proliferación de la flora patógena.

Hay escasas publicaciones que informen cuantitativamente respecto a la carga bacteriana del semen equino. Burns *et al.* (1975) reportaron una carga media de 5.7×10^5 bacterias/ml en el semen sin diluir de 10 padrillos. Vaid *et al.* (2012) reportaron en el semen fresco de 11 padrillos un recuento total de bacterias entre 2.9×10^3 UFC/ml y 5.5×10^5 UFC/ml, con una media de 210.000 UFC/ml, y citaron a Clément *et al.* (1993), que en 88 eyaculados hallaron una carga bacteriana total de $1.1-2.6 \times 10^4$ UFC/ml.

Además, la efectividad de un antibiótico *in vitro* no garantiza la eliminación de los efectos adversos de las bacterias (o sus toxinas) en la integridad de la membrana y motilidad espermática. Debe tenerse en cuenta que algunos antibióticos, especialmente la polimixina B, afectan negativamente la motilidad, y la concentración en que se agregan al diluyente también es determinante (Aurich, 2005).

En resumen, es por la gran diversidad de diluyentes, la variación individual del semen de los equinos y formas de procesamiento, que se obtienen diferentes resultados al preservar semen para posteriormente utilizarlo en inseminación artificial.

Por esto, al incluir un padrillo en un programa de inseminación artificial, debe evaluarse y comparar el efecto de los diluyentes disponibles en un número representativo de eyaculados, para finalmente seleccionar al que muestre los mejores índices en los parámetros de calidad seminal evaluados para ese padrillo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño:

Experimento prospectivo con dos partes:

- a. Colecta y evaluación de semen
- b. Cultivo y evaluación microbiológica del semen

2. Lugar y tiempo:

Laboratorio de Producción Equina (parte 1.a) y Laboratorio de Patología Animal (parte 1.b), Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba, Argentina). La fase experimental se desarrolló entre noviembre de 2015 y marzo de 2016.

3. Animales:

- a. Un padrillo de raza Criolla, de 9 años de edad.

Alojado en un corral individual al aire libre en el predio del Laboratorio de Producción Equina, clínicamente sano, con fertilidad conocida, libre de infecciones de transmisión sexual y en DSO. Entrenado para colecta de semen con vagina artificial y maniquí.

Es alimentado con heno de alfalfa dos veces al día, alimento balanceado para mantenimiento y suplemento de grano de cebada. Permanece en un potrero con verdeo durante 8 horas diariamente.

- b. Yeguas positivas al retajeo (en estro o estrogenizadas).

4. Procedimiento:

- a. Colecta de semen: se utilizó maniquí y vagina artificial Missouri (con funda interna descartable de nylon), lavada con agua y sumergida en alcohol etílico 70% durante 20 minutos luego de su uso. Antes de cada colecta, el pene del padrillo fue lavado desde el glande hasta la base con agua corriente tibia y secado con toallas de papel, previa estimulación con una yegua positiva al retajeo (Brinsko, 2011 a).

- b. Evaluación de semen: realizada según Baumber – Skaife (2011). El procesamiento del semen comenzó dentro de los 5 minutos posteriores a la colecta. Se extrajo la fracción de gel y se estimó el volumen mediante pesaje en balanza digital. La motilidad progresiva se evaluó en microscopio óptico, colocando una gota de semen en un portaobjetos atemperado en platina térmica. La concentración espermática se determinó por recuento en cámara de Neubauer. Se usaron cintas para medición de pH.

Para el test de hiposmolaridad (HOST) se utilizó una solución de lactosa en agua bidestilada (18g/L). Se agregaron 100µL de semen a 1ml de dicha solución, previamente atemperada, y se incubó por 20 minutos a 37°C en estufa. Luego se colocó una gota en portaobjetos y se contaron 100 células, registrando la respuesta de cada una a la prueba.

Para evaluar la morfología espermática se realizó un extendido con 10µL de PBS y 10µL de semen, y luego se coloreó con tinción Diff Quick. Se contaron 200 células en microscopio óptico (objetivo 100x) con aceite de inmersión.

Se utilizaron dos diluyentes: Diluyente de Kenney con antibiótico (preparado en un laboratorio bajo normas estandarizadas) y diluyente comercial Equiplus® (Minitüb GmbH).

Tabla 1: Composición de los diluyentes utilizados en el ensayo

DILUYENTE	COMPOSICIÓN	ANTIBIÓTICOS	ESPECTRO DE ACCIÓN
Diluyente de Kenney con antibiótico	2,4 g de leche descremada en polvo sin aditivos 4,9 g de glucosa 2 ml de bicarbonato de sodio (8,4%) 92 ml de agua deionizada	Ticarcilina Clavulánico	G- (especialmente contra <i>Pseudomona aeruginosa</i> y enterobacterias)
Equiplus® (Minitüb GmbH)	Caseinatos DMP (proteínas definidas de la leche) Azúcares y glicina	Lincomicina Espectinomomicina	Amplio espectro (G+, G- y <i>Mycoplasma spp.</i>) Efecto sinérgico por la asociación.

En el semen crudo se midieron las variables de motilidad progresiva y concentración espermática, y luego se tomaron seis alícuotas. Dos fueron diluidas en Equiplus®, dos en diluyente de Kenney con antibiótico, y dos permanecieron como control. Las diluciones se hicieron hasta una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml.

Un grupo de tres muestras (semen crudo, semen + diluyente de Kenney, y semen + Equiplus®) se mantuvo a 24°C en baño térmico durante 12 horas, y el otro grupo permaneció refrigerado en Equitainer™ (4°C) por 24 horas.

Las variables medidas en cada muestra fueron:

- i. Motilidad progresiva (porcentaje), estimada a doble ciego
- ii. pH
- iii. Integridad de membrana (porcentaje de espermatozoides positivos en test de hiposmolaridad)
- iv. Morfología (porcentaje de espermatozoides normales)
- v. Crecimiento bacteriano (UFC/ml)

Cada una de las variables se evaluó en cada muestra en el tiempo 0 (aproximadamente 5 minutos después de efectuar las diluciones), a las 0,5 hs y a las 12 hs para el grupo de muestras mantenido a 24°C. En el grupo de muestras refrigerado, a las 12 y 24 hs. (Ver esquema de trabajo en Anexo I, pag.31).

c. Evaluación microbiológica: se extrajeron alícuotas de cada muestra en el tiempo correspondiente, que fueron trasladadas y mantenidas a 4°C. Se sembró un volumen final de 20µL de cada muestra pura y en dilución 1/10 en agua destilada esterilizada, en agar sangre y agar MacConkey. Posteriormente se cultivaron en estufa a 38°C durante 48 hs.

Las siembras se llevaron a cabo al finalizar la evaluación de semen en cada tiempo, y los recuentos de células viables en placa se registraron 12, 24 y 48 hs posteriores a la siembra en el agar (Madigan *et al.*, 2009).

Se efectuó resiembra y luego tinción de Gram a las colonias con diferente morfología.

5. Análisis estadístico:

El primer análisis estadístico descriptivo aplicado fue el diagrama de cajas o *box plot*, realizado para cada variable. Es un gráfico basado en cuantiles, mediante el cual se visualiza un conjunto de datos.

Los gráficos de cajas tienen por objeto reflejar la forma de la distribución de frecuencias de cada grupo de observaciones, dando en un mismo gráfico información acerca de la mediana, la media, los cuantiles 0,05, 0,25, 0,75 y 0,95 y mostrando la presencia, si los hubiere, de valores extremos. Proporcionan información útil para realizar un análisis descriptivo integral del conjunto de datos obtenidos.

Está compuesto por un rectángulo (caja) y dos brazos (bigotes) que suministra información sobre los valores mínimos y máximos (L_i y L_s , respectivamente), los cuantiles Q_1 (25% de los datos), Q_2 ó mediana (50% de los datos) y Q_3 (75% de los datos), la existencia de valores atípicos u *outliers* y la simetría de la distribución (Figura 1).

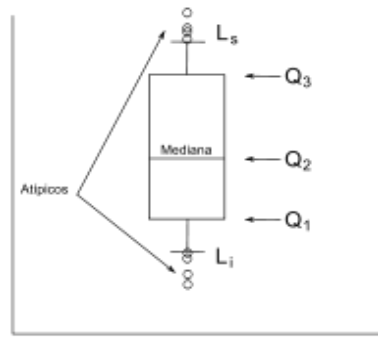


Fig. 1. Esquema de un diagrama de caja.

En segundo lugar se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA)¹, método desarrollado por R.A. Fisher (1920), base del análisis estadístico de la mayoría de los diseños de experimentos. El análisis de la varianza permite comparar dos o más medias de forma simultánea. Plantea el problema como un modelo matemático, en el cual la variable dependiente es una variable cuantitativa, y la variable independiente es una variable cualitativa, a la que también se la denomina factor. Si existiera sólo una variable independiente el modelo se denomina unifactorial o de una vía, y si hubiera dos variables independientes se aplicaría el análisis de la varianza de dos vías.

El ANOVA permite descomponer la variabilidad total en una variación atribuible a causas conocidas, efectos de los tratamientos, y en otra debida a causas desconocidas que no pueden ser controladas por el experimentador y son atribuibles al azar (error experimental); esta última es considerada como la variación intrínseca a la unidad experimental. La asignación de los tratamientos a las unidades experimentales en forma aleatoria es una manera de controlar esta variación desconocida.

En este trabajo se utilizó un Modelo de Efectos Fijos o Modelo I, donde los niveles del factor son especificados por el experimentador. Se desea probar hipótesis sobre las medias de los tratamientos y las conclusiones se aplican sólo a los niveles del factor considerado.

Como ya se mencionó, el análisis estadístico se basa en un modelo subyacente donde la respuesta puede ser descrita con el siguiente modelo de efectos, que se especifica a continuación:

¹ ANOVA: sigla en inglés para ANalysis Of VAriance.

$$\text{Modelo lineal de efectos: } y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: y_{ij} es la respuesta para la j-ésima observación en el tratamiento i, μ es la media general, τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento y ε_{ij} es el error experimental para la j-ésima observación en el tratamiento i.

Resumiendo: en el modelo de efectos fijos (Modelo I) la variable respuesta y_{ij} se puede expresar como la suma de tres componentes: 1) μ parámetro común a todos los tratamientos y a todos los elementos, constante, 2) τ_i parámetro constante para todos los elementos de la población i y 3) ε_{ij} variables aleatorias independientes distribuidas normalmente, con media cero y varianza común σ^2 , los errores se asumen independientes de los τ_i .

Es necesario tener presente que las conclusiones obtenidas en este procedimiento inferencial sólo serán válidas si los supuestos del ANOVA se verifican. Éstos se detallan a continuación:

Los errores deben ser independientes, tener distribución normal y varianza común.

El cumplimiento de dichos supuestos se controla haciendo un test para probar la normalidad, llamado test de Shapiro-Wilk, en el que la hipótesis nula contempla que los residuos tienen distribución normal, por lo que ésta no debería ser rechazada.

Por otra parte la homogeneidad de varianzas se estudia mediante la prueba de Levene. Se pone a prueba la hipótesis nula de que las varianzas poblacionales son iguales (llamado homogeneidad de varianza ú homocedasticidad). Si el p-valor resultante de la prueba de Levene es mayor a un cierto nivel de significación (típicamente 0,05), es muy probable que las diferencias obtenidas en las variaciones de la muestra se hayan producido sobre la base de un muestreo aleatorio de una población con varianzas iguales. Por lo tanto, la hipótesis nula de igualdad de varianzas no se rechaza y se concluye que no hay una diferencia entre las variaciones en la población. Si el p-valor asociado al estadístico de contraste es menor que el nivel de significación fijado se rechaza la H_0 de igualdad de varianzas y con ello no se cumpliría uno de los supuestos paramétricos en los que se basa este análisis, en consecuencia carecería de sentido aplicarlo.

Ante esta situación, una posible solución es la de transformar los datos hasta conseguir la homogeneidad entre las varianzas (transformación de variables).

Los cálculos del ANOVA se presentan en una tabla denominada tabla de análisis de la varianza que resume el conocimiento acerca de la variabilidad en las observaciones en el experimento.

Si mediante el ANOVA se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias, se acepta por defecto que existe al menos una diferencia. Los test de comparación múltiple permiten conocer cuántas diferencias hay y entre qué medias. En el presente análisis se utilizó el test de Tukey.

Se incluyeron los datos obtenidos de 9 eyaculados para la variable motilidad progresiva (%), y de 6 eyaculados para la variable crecimiento bacteriano (UFC/ml). El nivel de significancia fijado fue $\alpha=0,05$.

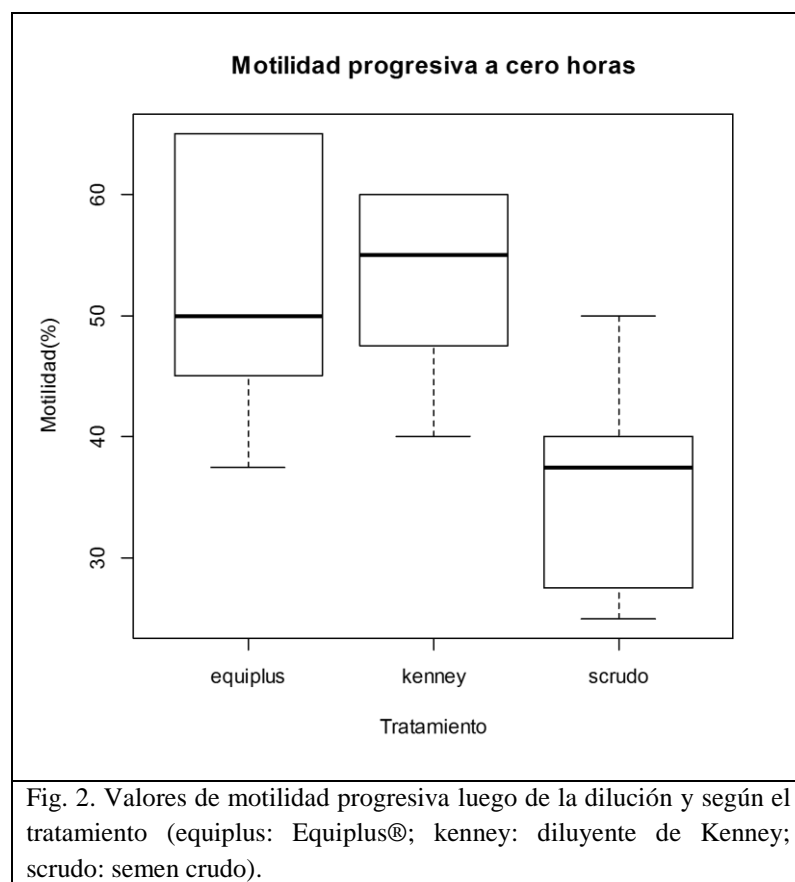
El análisis se llevó a cabo en el software *R* (*R* Core Team, Vienna, Austria, 2017).

RESULTADOS

1. Motilidad progresiva

a. Motilidad a **0 horas**

En la figura 2, se puede observar que existe una superposición de las cajas para los dos diluyentes, con lo cual se puede inferir que a nivel muestral ambos tienen el mismo comportamiento. A su vez se observó una gran variabilidad en los datos siendo el diluyente Equiplus® el que presenta mayor variación.

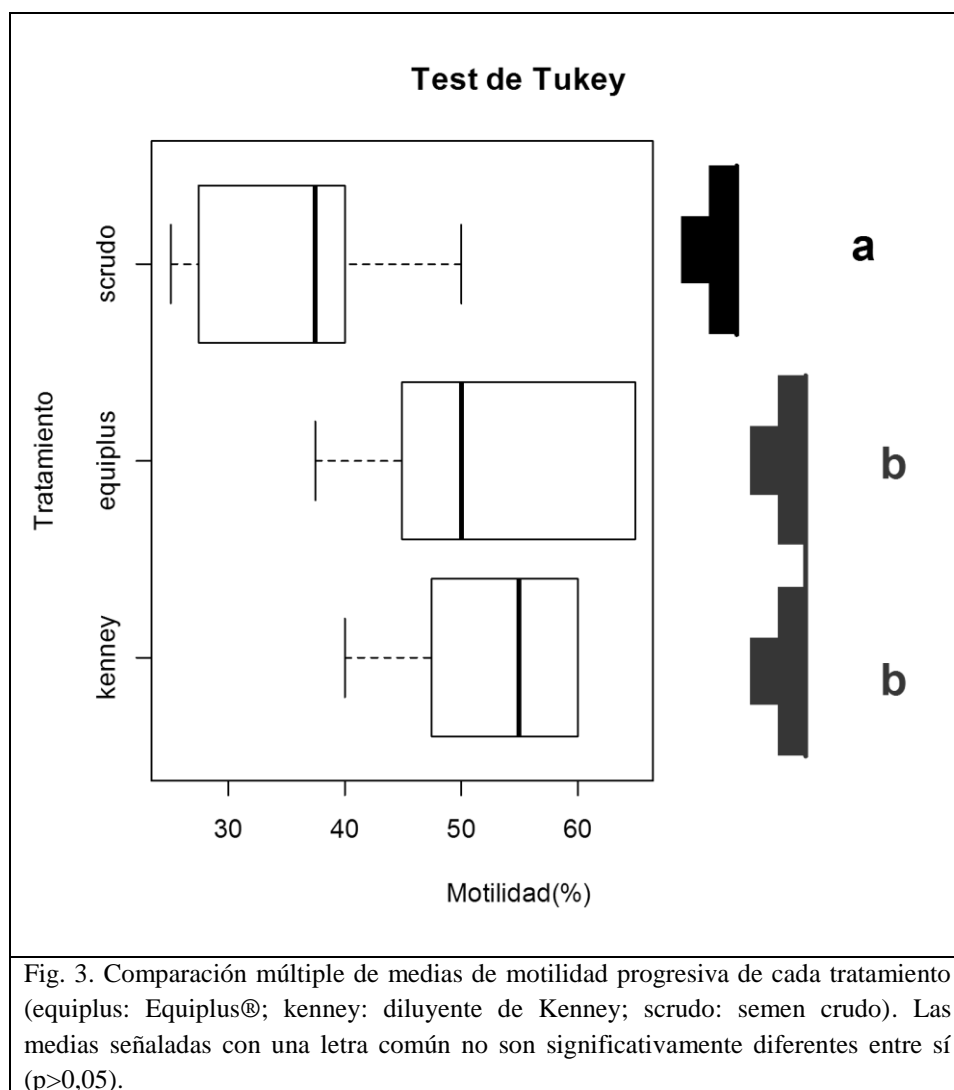


El ANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con $p=0,000487$ (Tabla 2).

Tabla 2: ANOVA de motilidad progresiva en cero horas

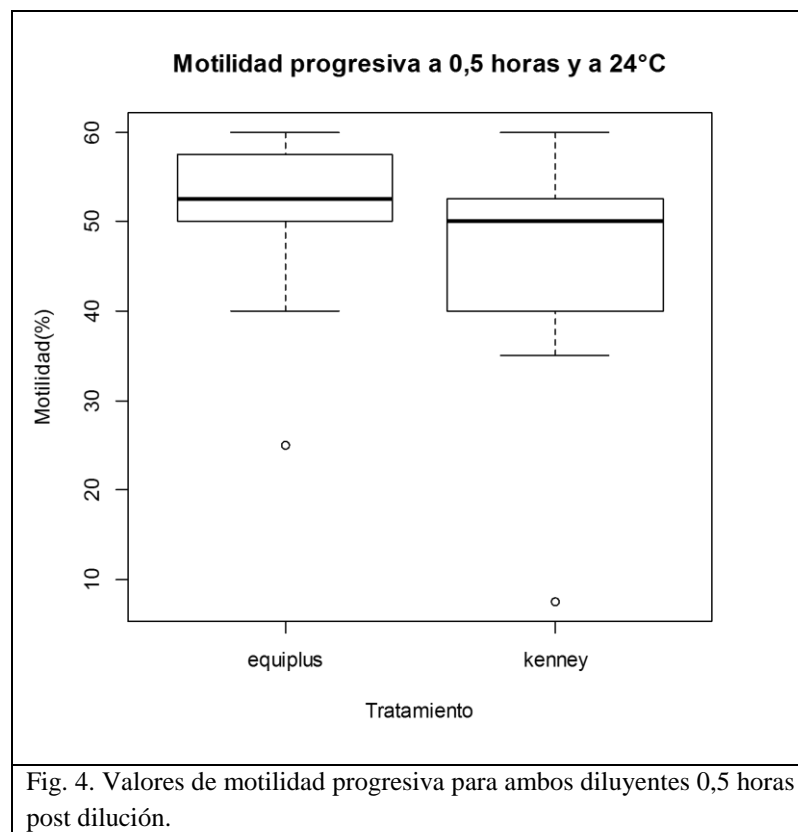
	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	2	1781	890.5	10.66	0.000487
Residuos	24	2006	83.6		

El test de comparaciones múltiples (Test de Tukey), mostró diferencias significativas entre el semen crudo y el diluido, pero no entre los diluyentes (Fig. 3).



b. Motilidad a 0,5 horas y 24°C

En el diagrama siguiente, la superposición de las cajas para ambos diluyentes evidencia un comportamiento similar para los mismos. La mayor variabilidad la presentó el diluyente de Kenney. Los dos puntos atípicos observados corresponden a valores de motilidad muy bajos, que no se excluyeron del análisis por no observarse ninguna particularidad durante el procesamiento del semen (Fig. 4).



Al no cumplirse los supuestos del ANOVA, se realizó la transformación de la variable elevándola al cuadrado. La Tabla 3 muestra los resultados de este análisis. Se observó que la diferencia entre ambos diluyentes no es estadísticamente significativa ($p=0,4$).

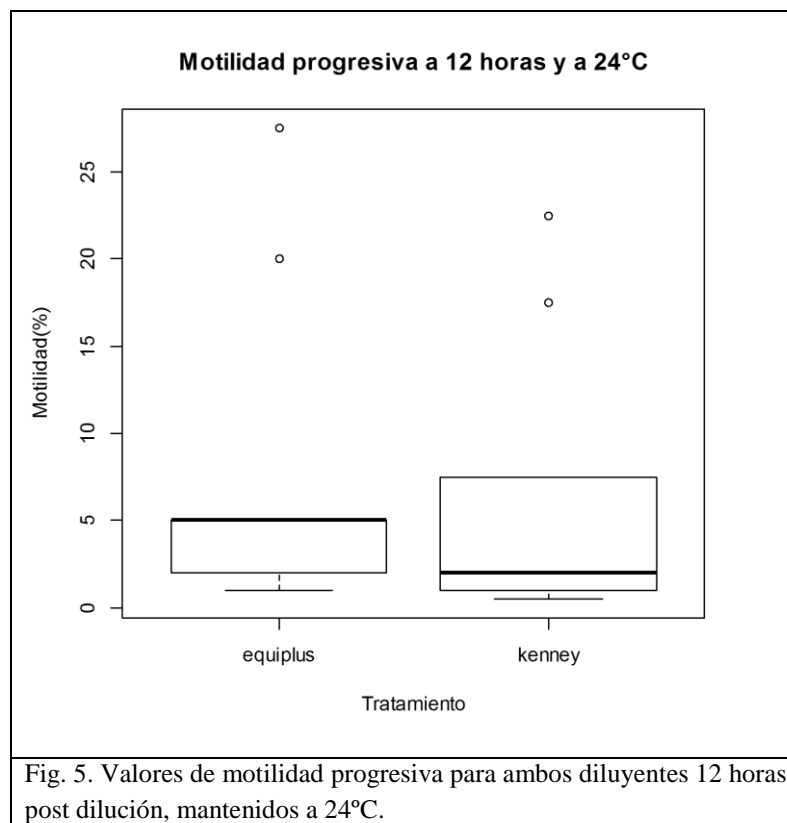
Tabla 3: ANOVA de motilidad progresiva en 0,5 horas y a 24°C

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	1	776050	776050	0.736	0.404
Residuos	16	16881884	1055118		

c. Motilidad a **12 horas y 24°C**

En el diagrama de cajas se observa nuevamente una superposición de los diluyentes. En cuanto a la variabilidad de las muestras, esta es mayor para el diluyente de Kenney (Fig. 5).

Los puntos atípicos se deben a dos registros de motilidad relativamente más altos, no excluidos del análisis porque no se hallaron particularidades durante el experimento.



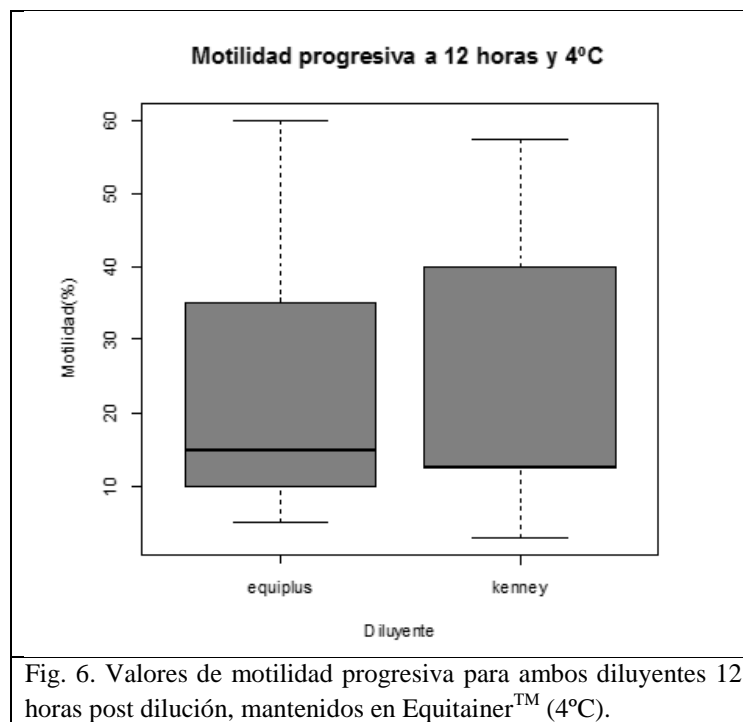
El análisis de la varianza tampoco arrojó diferencias significativas entre los diluyentes ($p=0,39$) (Tabla 4). Se normalizó la variable mediante el logaritmo decimal para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Tabla 4: ANOVA de motilidad progresiva en 12 horas y a 24°C

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	1	0.215	0.2154	0.751	0.399
Residuos	16	4.591	0.2869		

d. Motilidad a **12 horas y 4°C**

Las muestras mantenidas en Equitainer™ por 12 horas presentaron en los diagramas de cajas una superposición de los diluyentes (Fig. 6).



Como es esperable al observar la similitud de ambas cajas, el ANOVA (Tabla 5) permite descartar diferencias significativas con $p=0,867$. La variable se transformó mediante logaritmo decimal.

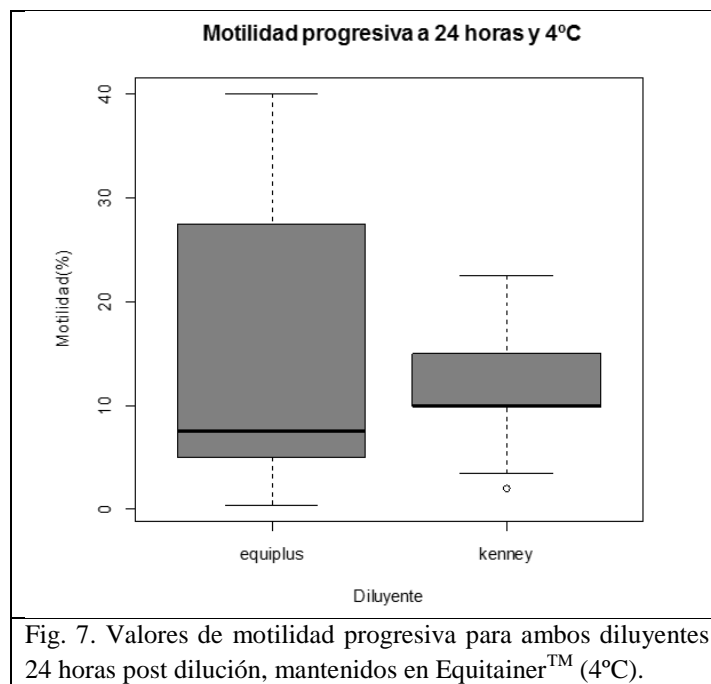
Tabla 5: ANOVA de motilidad progresiva en 12 horas y a 4°C

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	1	0.0042	0.00419	0.029	0.867
Residuos	16	2.3325	0.14578		

e. Motilidad a **24 horas y 4°C**

Se encontró una mayor variabilidad en el grupo diluido con Equiplus® respecto al tratado con diluyente de Kenney (Fig. 7), como así también una superposición de las cajas.

Hay un punto atípico por debajo del límite inferior en el grupo tratado con diluyente de Kenney, que como en los casos mencionados anteriormente no pudo atribuirse a un efecto detectable durante el desarrollo del ensayo.



Las diferencias encontradas entre ambos tratamientos no son significativas (Tabla 6). Nuevamente, fue necesaria la transformación de la variable mediante logaritmo decimal.

Tabla 6: ANOVA de motilidad progresiva en 24 horas y a 4°C

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	1	0.015	0.01473	0.062	0.806
Residuos	16	3.777	0.23604		

2. Crecimiento bacteriano

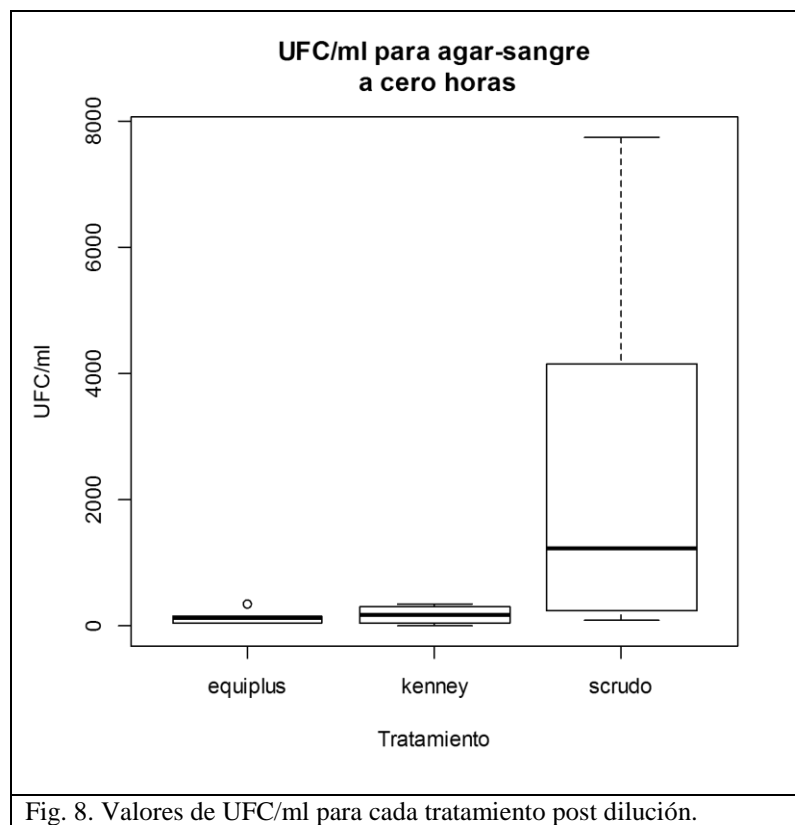
Para la evaluación microbiológica del semen se incluyeron en el análisis de la varianza las concentraciones de UFC/ml de las muestras de 6 eyaculados, obtenidos a partir del recuento en placas de agar sangre luego de 24 horas de cultivo.

En todos los análisis presentados a continuación la variable se normalizó con la transformación logaritmo (UFC/ml + 1), de forma que se cumplieran los supuestos.

a. UFC/ml a 0 horas

En el diagrama de cajas (Fig. 8) se puede apreciar la gran variabilidad de la concentración bacteriana en el semen crudo.

El punto atípico corresponde a un recuento relativamente alto de bacterias en placa en el área de siembra de semen con Equiplus®, sin observar una contaminación ambiental evidente de la muestra durante la manipulación.

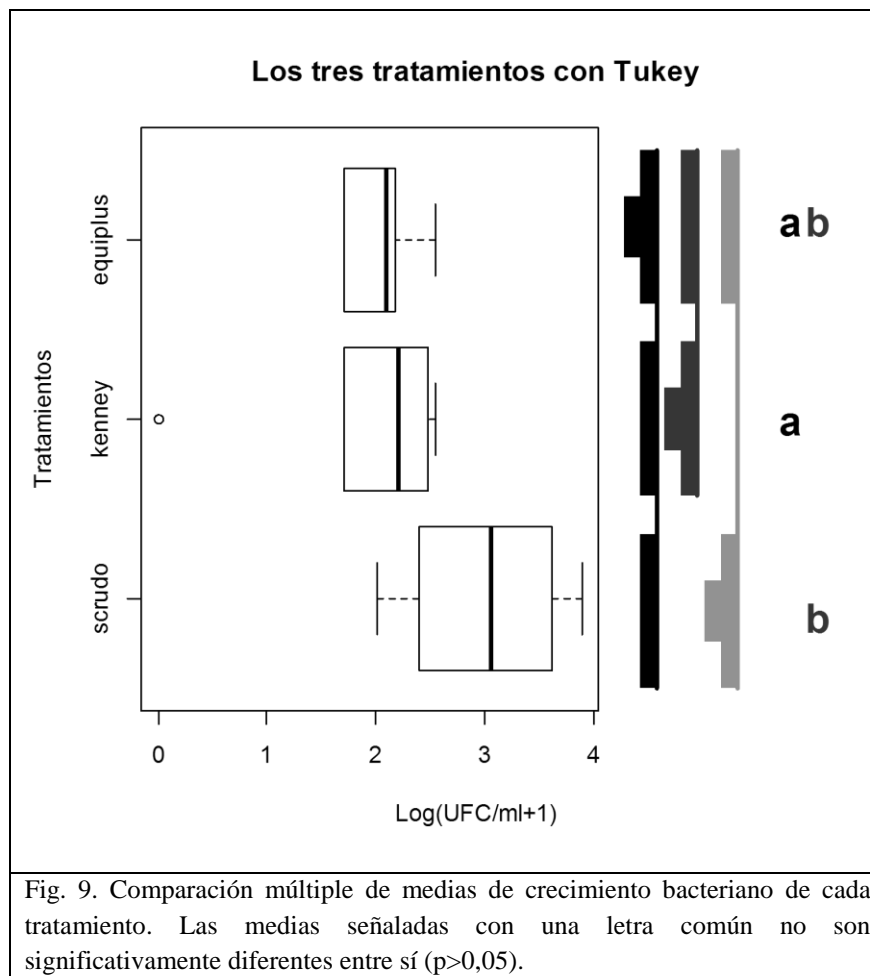


Al comparar las medias de las concentraciones de UFC inmediatamente después de realizar las diluciones, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$) (Tabla 7).

Tabla 7: ANOVA de concentración de UFC/ml en cero horas.

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	2	4.512	2.256	4.363	0.0321
Residuos	15	7.756	0.517		

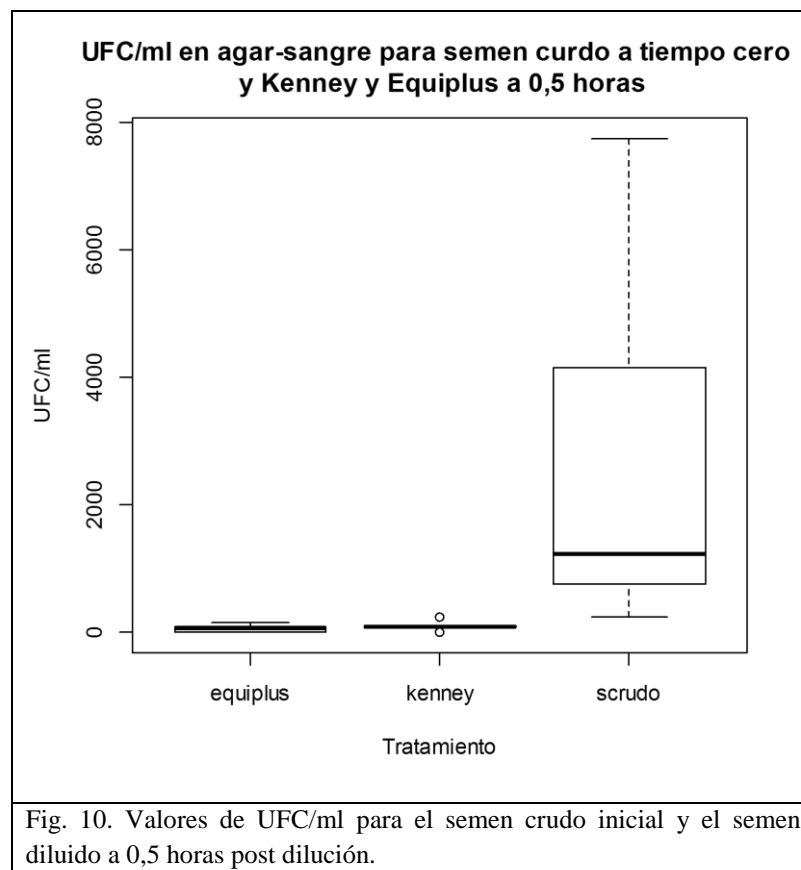
Mediante la aplicación del test de Tukey se observa que las diferencias son significativas sólo entre el semen crudo y el diluyente de Kenney (Fig. 9). Con las variables transformadas, es más fácil visualizar y comparar las cajas de los tres tratamientos, evidenciando que las cajas de ambos diluyentes se superponen, sus medianas y sus valores máximos y mínimos son similares, y ambos valores mínimos coinciden con el primer cuartil.



b. UFC/ml en *semen crudo* a 0 horas y *Kenney* y *Equiplus*® a 0,5 horas

En el diagrama de cajas (Fig. 10) se observa superposición de las cajas de ambos diluyentes.

Nuevamente se encuentran puntos atípicos, por encima y por debajo de los valores extremos encontrados en el grupo de muestras tratadas con *Kenney*.



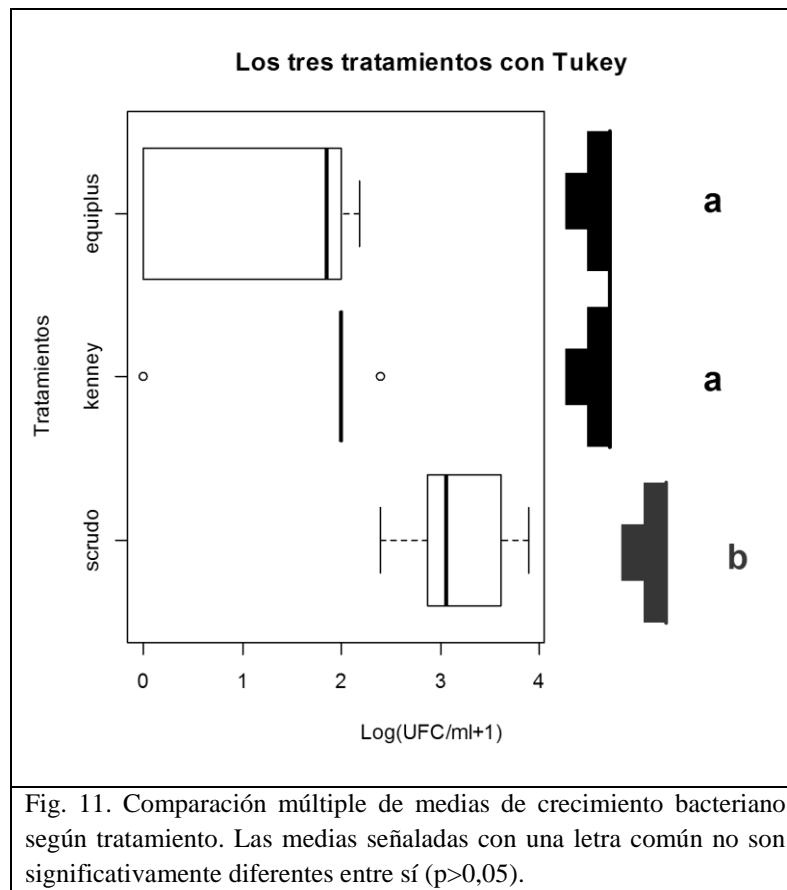
Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis de la varianza expuesto en la tabla 8 permite establecer que la concentración de UFC fue significativamente menor a las 0,5 horas en el semen diluido con respecto a la inicial ($p=0,0046$).

Tabla 8: ANOVA de concentración de UFC/ml para semen crudo a cero horas y Kenney y Equiplus® a 0,5 horas.

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	2	11.06	5.528	7.869	0.0046
Residuos	15	10.54	0.702		

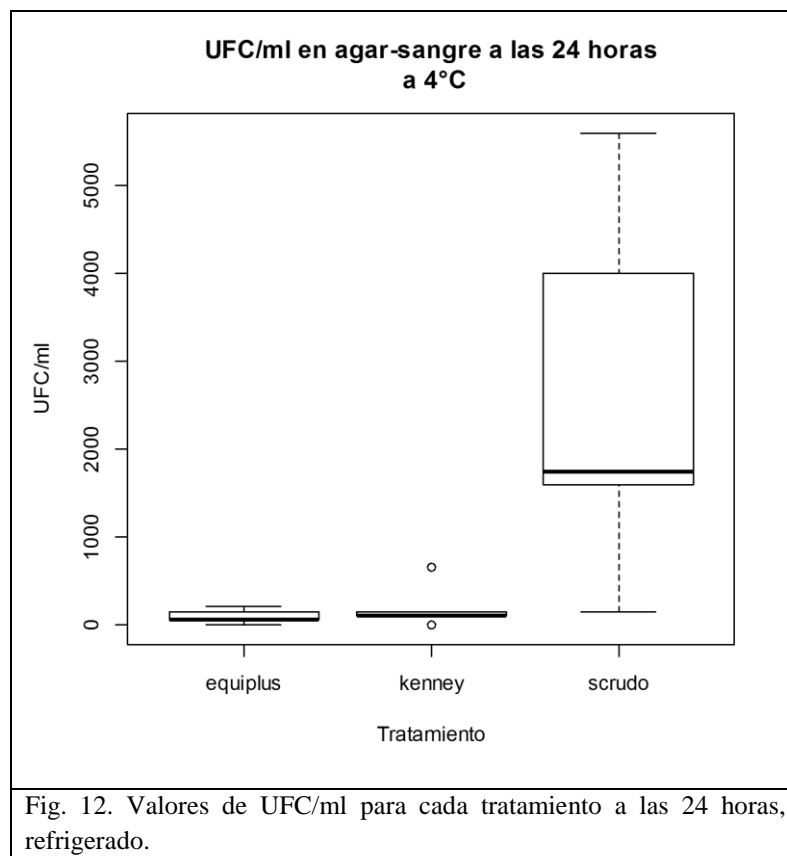
Esta diferencia se comprueba mediante el test de comparación múltiple, en el cual se ve que luego de 30 minutos ambos diluyentes son significativamente distintos del semen crudo inicial, y no hay diferencia entre sí (Fig. 11).

La caja del diluyente de Kenney muestra los dos puntos atípicos que se observaron en la figura 10, y que los demás valores se encuentran cercanos a la mediana, por lo tanto los tres cuartiles no se alcanzan a distinguir entre sí.



c. UFC/ml a **24 horas y 4°C**

En el *box plot* de la figura 12 se puede ver la gran variabilidad en la concentración bacteriana en el semen crudo, y la superposición de las cajas de ambos diluyentes. Se registraron puntos atípicos por encima y por debajo de los valores mínimo y máximo de las muestras diluidas en Kenney.

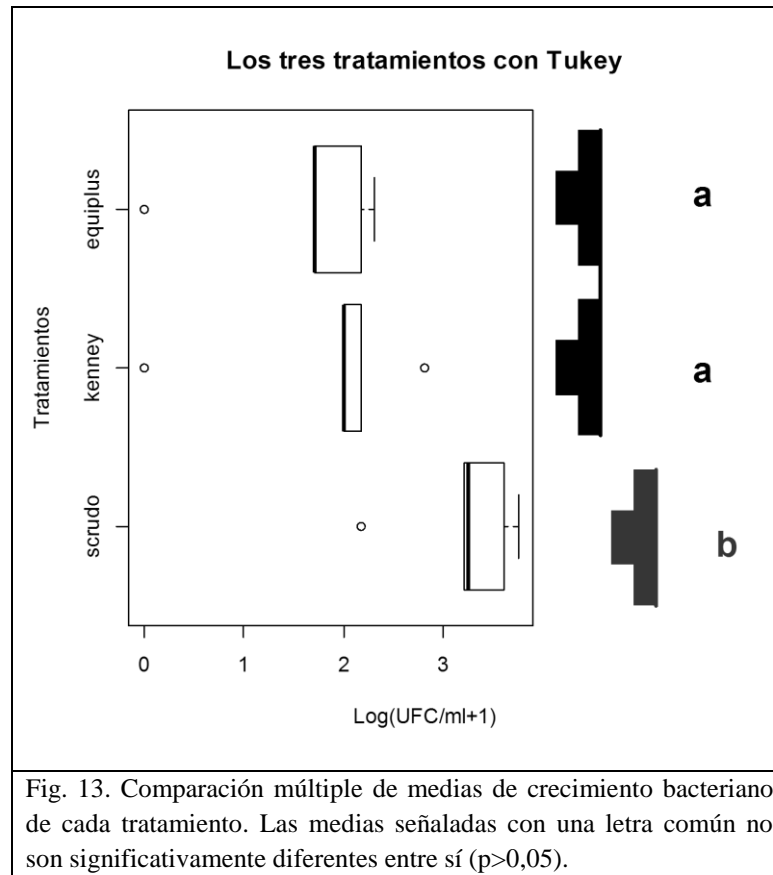


La proliferación bacteriana es significativamente mayor ($p=0,00667$) en el semen crudo incluso habiendo estado expuesto a 4°C durante 24 horas (Tabla 9).

Tabla 9: ANOVA de concentración de UFC/ml en 24 horas y a 4°C .

	GL	Sum Cu	Cu Medio	F valor	Pr(>F)
Tratamiento	2	8.994	4.497	7.129	0.00667
Residuos	15	9.462	0.631		

El test de Tukey realizado a partir de la variable normalizada muestra que no hay diferencias significativas entre los diluyentes en cuanto al efecto antibacteriano (Fig. 13).



El agar MacConkey se excluyó del análisis estadístico porque para los tiempos y temperaturas evaluados, sólo se registró crecimiento en 1/48 placas. En esta placa se sembró semen diluido en Equiplus® 30 minutos post dilución, y luego de 24 horas de cultivo se registraron 50 UFC/ml (la mínima cantidad detectable mediante el procedimiento empleado).

De la totalidad de placas con agar MacConkey sembradas, se halló desarrollo de colonias luego de 24 horas de cultivo en 7/90 (7,7%). Cinco correspondieron a las muestras de semen crudo mantenido a 24°C por 12 horas. Las dos restantes correspondieron a muestras de semen diluido en Equiplus®: una ya mencionada, y la otra mantenida a 24°C por 12 horas.

En cuanto a las colonias observadas en placa, dado que el objetivo del presente trabajo no fue tipificar bacterias, sólo se realizó tinción de Gram a los repiques de las UFC con morfologías diferentes (ver tabla en Anexo II, pág. 32).

Se registró el crecimiento de un hongo en 3/90 placas de agar sangre, circunscripto al área de siembra del semen crudo correspondiente a dos eyaculados.

DISCUSIÓN

Es incorrecto extrapolar un ensayo llevado a cabo con un único padrillo, por esto no debe perderse de vista el objetivo del presente trabajo: evaluar y comparar dos diluyentes teniendo en cuenta diferentes parámetros indicativos de la calidad del semen, haciendo uso de las herramientas a las que un veterinario de campo puede acceder.

Además debe tenerse en cuenta que, si bien los eyaculados de un mismo animal son variables entre sí, la principal fuente de variación al comparar la efectividad de diluyentes es el padrillo. Por ello las conclusiones están limitadas a este individuo.

Motilidad progresiva:

No se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los valores de motilidad progresiva al comparar el diluyente de Kenney con Equiplus® para ninguno de los tiempos y temperaturas de conservación probados en este ensayo, pero en el semen refrigerado se observaron los mayores porcentajes en Equiplus® (figs. 6 y 7).

Aunque está bien documentado el mayor efecto protector de la membrana plasmática de los espermatozoides por parte de los diluyentes que contienen proteínas definidas de la leche (Batellier *et al*, 1997; Aurich, 2005), se sabe que este efecto protector es más evidente luego de al menos 24 horas de almacenamiento en refrigeración (Pagl *et al*, 2006; Brinsko *et al*, 2011). Esta tendencia se vio reflejada en el ensayo, dado que la diferencia entre los dos diluyentes a 4°C fue mayor a las 24 horas con respecto a las 12 horas.

La similitud entre las medias obtenidas podría deberse a que los mayores daños en la configuración de la membrana plasmática y el eflujo de colesterol ocurren durante la fase de transición, entre los 19 y los 8°C, y dependen de la tasa de enfriamiento (Graham, 2011), factores que se vieron controlados por la utilización de un dispositivo diseñado para ello (Equitainer™). También podría explicarse si el plasma seminal del padrillo utilizado no es rico en proteínas perjudiciales.

Sin embargo, es importante remarcar que la motilidad progresiva por sí sola no es el mejor método para evaluar la eficacia de un diluyente (Burns y Herickhoff, 2014).

No se incluyeron en el análisis estadístico los datos de motilidad progresiva del semen crudo porque fueron del 0% en 21/27 registros para esta variable luego de las 0,5 horas, tanto a 24°C como a 4°C.

Crecimiento bacteriano:

En cuanto a los parámetros microbiológicos, se pudo apreciar un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano significativo después (~5 minutos) de la adición del diluyente de Kenney con ticarcilina+ácido clavulánico, y a los 30 minutos fue evidente la acción

antibacteriana de ambos diluyentes con respecto a la concentración de bacterias presentes en el semen crudo inicialmente. Burns *et al* (1975) reportaron una disminución del 93% de bacterias en el semen luego de 15 minutos de exposición a un diluyente con penicilina sódica y gentamicina sulfato.

Luego de 24 horas de almacenado en Equitainer™, la concentración bacteriana disminuyó considerablemente en el semen sin antibióticos, pero como era de esperarse la diferencia con ambos diluyentes se mantuvo significativa.

La ausencia de crecimiento en agar MacConkey (83 placas negativas/90 sembradas) indica: 1) cargas inferiores a 50 UFC/ml de enterobacterias y cocos gramnegativos, dado que sólo hubo crecimiento en muestras de semen crudo (5/6) luego de permanecer 12 horas en el baño térmico, y 2) efectividad de los antibióticos en ambos diluyentes frente a estas bacterias, porque no se registraron UFC en las muestras diluidas mantenidas en las mismas condiciones que el semen crudo que sí mostró crecimiento.

Se observaron hongos en el área de siembra del semen crudo de dos colectas. Se desarrollaron únicamente en la muestra post dilución en un eyaculado, y en las muestras post dilución y luego de 0,5 horas del otro eyaculado, no hallándose en tiempos posteriores a estos en los mismos eyaculados.

Fueron identificados en base a su morfología macroscópica y en frotis como hongos de clase *Zygomycetes*, que comúnmente están involucrados en la descomposición de los alimentos.

Vaid *et al.* (2012) exponen que los hongos no son comunes en el semen o el tracto reproductivo de los padrillos, pero pueden ser contaminantes si las condiciones de colecta y procesamiento del semen no están monitoreados. Sin embargo, en el mismo trabajo mencionan que *Aspergillus spp.* ha sido reportado en el tracto reproductivo de padrillos sanos.

Teniendo en cuenta el tipo de hongo y el hecho de que los antibióticos carecen de efecto antifúngico, se especula la contaminación de las muestras a partir del tubo en el que se almacenó el semen crudo en cada caso.

Este ensayo se completaría comparando las tasas de preñez logradas mediante inseminación artificial utilizando ambos diluyentes.

CONCLUSIÓN

Para este padrillo y en las condiciones de conservación evaluadas, el diluyente de Kenney con ticarcilina y ácido clavulánico, preparado bajo normas estandarizadas, mantuvo en un nivel similar la motilidad progresiva y la concentración bacteriana (con inhibición del crecimiento aún más temprana) en comparación a Equiplus®.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALLEN, W.R. y D.F ANTCZAK. 2000. Reproduction and modern breeding technologies in the mare. En: **The genetics of the horse**. Ed: BOWLING A.T y A. RUVINSKY. 1^{ra} ed. CAB International. Oxon, U.K. Cap. 12. p: 326 – 329.
2. AURICH, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal reproduction science** (89): p. 65-75.
3. AURICH, C. 2011. Semen extenders for cooled semen (Europe). En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 131.
4. BATELLIER, F.; M. MAGISTRINI; J. FAUQUANT y E. PALMER. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology** (48): p. 391–410.
5. BATELLIER, F; M. VIDAMENT; J. FAUQUANT; G. DUCHAMP; G. ARNAUD; J.M YVON y M. MAGISTRINI. 2001. Advances in cooled semen technology. **Animal reproduction science** (68): p. 181–190.
6. BAUMBER – SKAIFE, J. 2011. Evaluation of semen. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 124.
7. BOWEN, J. M. 2011. Historical perspectives of artificial insemination. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 122.
8. BRINSKO, S. 2011 a. Semen collection techniques and insemination procedures. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap.123.
9. BRINSKO, S. 2011 b. Semen extenders for cooled semen (North America). En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 132.
10. BRINSKO, S; T. BLANCHARD; D. VARNER; J. SCHUMACHER; C. LOVE; K. HINRICHS y D. HARTMAN. 2011. **Manual of Equine Reproduction**. 3^{ra} ed. Mosby Elsevier. Caps. 12 y 14.
11. BURNS, P.D y L.A HERICKHOFF. 2014. DNA fragmentation as an early indicator of extender efficacy: a preliminary study. **Journal of Equine Veterinary Science** (34): p. 375-379.
12. BURNS, S.J; R.B.S SIMPSON y J.R SNELL. 1975. Control of microflora in stallion semen with a semen extender. En: **Equine Reproduction. Proceedings of the first international symposium on Equine Reproduction**. Blackwell Scientific publications. P. 139-142.
13. CONBOY, H. S. 2011. Management of stallions in artificial insemination. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 117.

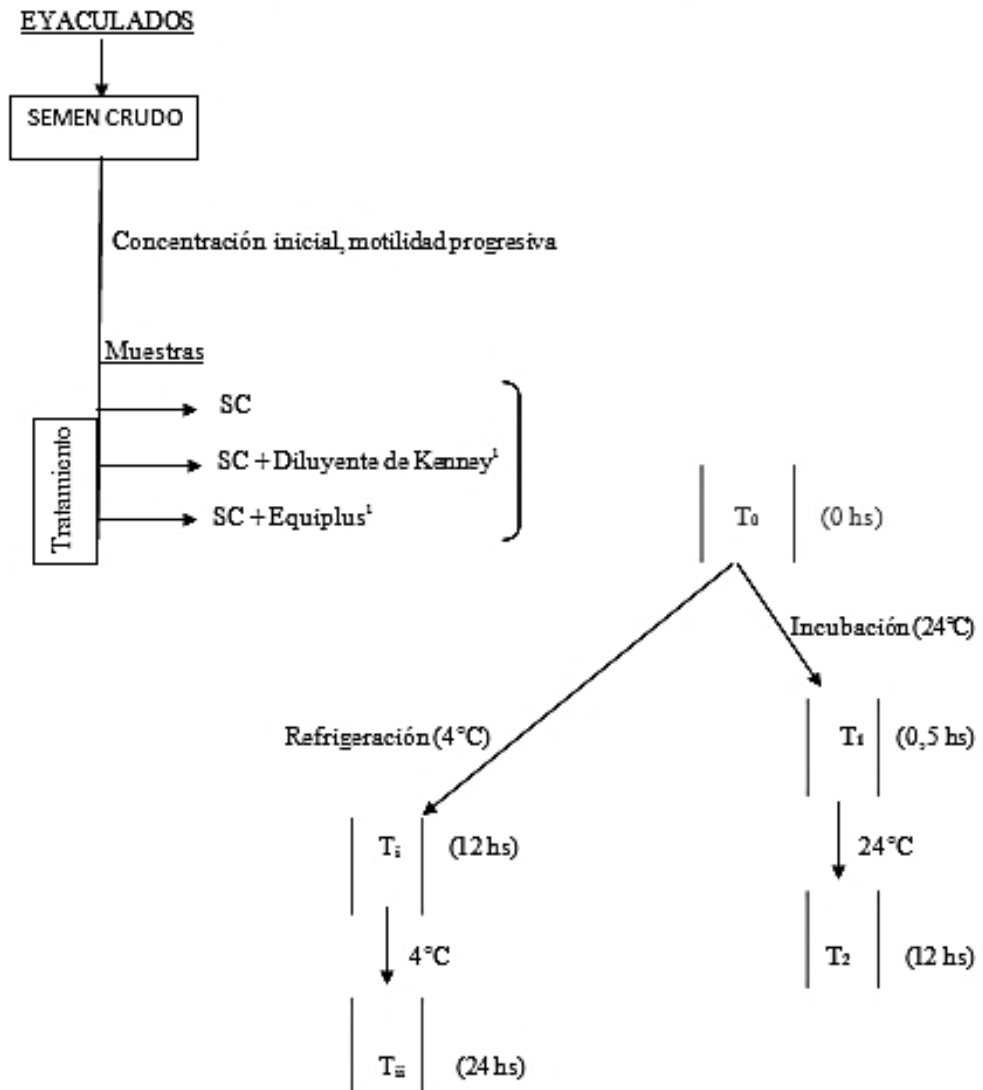
14. DAVIES MOREL, M. C. G. 1999. **Equine Artificial Insemination**. Ed. CAB International, Oxon, U.K. Caps 1 y 7.
15. DEAN, J.C; A.M HOBGOOD; G.P BLODGETT; C.C LOVE; T.L BLANCHARD y D.D VARNER. 2012. The addition of ticarcillin-clavulanic acid to INRA 96 extender for stallion semen cooling. **Equine Veterinary Journal** (44): p. 95-99.
16. DIETZ, J.P; P.L SERTICH; R.C. BOSTON y C.E. BENSON. 2007. Comparison of ticarcillin and piperacillin in Kenney's semen extender. **Theriogenology** (68): p. 848–852
17. DUTRA MUÑOZ, C; F. GRAGLIA GIMENEZ y M. N. MARTÍNEZ PEREIRA MACHADO. 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™)*. Tesis de grado. Fac. de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 52 p.
18. GRAHAM, J.K. 2011. Principles of cooled semen. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 127.
19. HODDER, A.D.J. e I.K.M LIU. 2011. Spermatozoal motility. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 125.
20. KATILA, T. 2011. Containers for transport of equine semen. En: **Equine reproduction**. Ed: McKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap.130.
21. MADIGAN, M.T.; J. M. MARTINKO; P. V. DUNLAP y D. P. CLARK. 2009. *Brock Biología de los microorganismos*. 12^{ma} ed.Ed. Pearson Educación. Madrid, España. Cap. 6. p: 167 – 170.
22. MANJUNATH, P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction** v.9, n.4, p. 809-815.
23. McCUE, P.M y R.A. FERRIS. 2015. Endometrial culture, cytology and biopsy – new approaches to time-tested techniques. **Bluegrass symposium**. Lexington, Kentucky, USA.
24. McKINNON, A.O. 2013. Some selected diseases of the breeding stallion. En: **Reproducción equina III: Trabajos presentados en el III Congreso Argentino de Reproducción Equina**. Ed: LOSINNO, L. 1^{ra} ed. UniRío Editora, Río Cuarto, Argentina. p. 59 – 61.
25. ORTEGA-FERRUSOLA, C; L. GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; A. MURIEL; B. MACÍAS-GARCÍA; H. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; J. A. TAPIA; J. M. ALONSO y F. J. PEÑA. 2008. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezability of the stallion sperm? **Reproduction in domestic animals** (44): p. 518-522.
26. PAGL, R.; J.E AURICH; F. MÜLLER-SCHLÖSSER; M. KANKOFER y C. AURICH. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fraction with a skim-milk based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology** (66): p. 1115-1122.
27. PEÑA, F.J; M. PLAZA DAVILA; B.A. BALL; E.L. SQUIRES; P. MARTIN MUÑOZ; C. ORTEGA FERRUSOLA y C. BALAO DA SILVA. 2015. The impact of reproductive

- technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in domestic animals** (50): p. 529-537.
28. PICKETT, B.W. y J. L. VOSS. 1975. The effect of semen extenders and sperm number on mare fertility. En: **Equine Reproduction. Proceedings of the first international symposium on Equine Reproduction**. Blackwell Scientific publications. P. 95-98.
 29. RAMIRES NETO, C; Y.F.R SANCLER DA SILVA; H. LACERDA RESENDE; P. NASCIMENTO GUASTI; G.A MONTEIRO; P.M PAPA; J.A DELL'AQUA JUNIOR; J.N.P PUOLI FILHO; M.A ALVARENGA y F.O PAPA. 2015. Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science** (35): p. 277-282.
 30. RIGBY, S.L; S.P. BRINSKO; M. COCHRAN; T.L. BLANCHARD; C.C. LOVE y D.D. VARNER. 2001. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science** (68): p. 171-180.
 31. SAMPER, J.C. 2009. Artificial Insemination with fresh and cooled semen. En: **Equine breeding management and artificial insemination**. 2^{da} ed. Saunders Elsevier. Cap. 14.
 32. SAMPER, J.C. 2011. Breeding with cooled transported semen. En: **Equine reproduction**. Ed: MCKINNON, A. O; E. L. SQUIRES; W.E. VAALA y D.D. VARNER. 2^{da} ed. Blackwell Publishing. Chichester, U.K. Cap. 128.
 33. TIBARY, A; J. RODRIGUEZ y J. C. SAMPER. 2009. Microbiology and diseases of semen. En: **Equine breeding management and artificial insemination**. 2^{da} ed. Saunders Elsevier. Cap. 10.
 34. VAID, R.K.; A. ARANGASAMY; T. TALLURI; S. RAVI; B. C. BERA; T. ANAND; T. RIYESH; N. VIRMANI; P. MALIK Y R. K. SINGH. 2012. Microbial quality of fresh and frozen equine semen of Indian horses. **Veterinary practitioner** (13): p. 336-339.

ANEXO I

Esquema de trabajo

- Eyaculados: 9
- Tratamientos: diluyente de Kenney con antibióticos, Equiplus® y semen crudo (control).
- Variables: Motilidad progresiva, morfología, pH, integridad de membrana plasmática, morfología y crecimiento bacteriano. Se miden en T_0 , T_1 , $T_{\bar{a}}$, T_1 y T_2 . Además de la concentración inicial y motilidad progresiva en semen crudo (SC).



¹Dilución de la muestra a 50 millones de espermatozoides/ml.

ANEXO II

Características de los microorganismos cultivados en agar sangre y MacConkey y su correlación con los microorganismos frecuentemente aislados del tracto reproductivo de los equinos.

Adaptada de McCue y Ferris (2015).

Microorganismo	Gram	Morfología	Agar sangre	Agar MacConkey
<i>Streptococcus spp.</i>	Positivo	Cocos en cadena	Colonias circulares blancas y pequeñas. α y β hemólisis	Sin crecimiento
<i>Staphylococcus spp.</i>	Positivo	Cocos en racimo	Colonias circulares medianas amarillentas. Hemólisis leve	Sin crecimiento o limitado de colonias rosas
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	Bacilos	Colonias circulares blancas medianas. α hemólisis	Colonias circulares rosas
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Negativo	Bacilo	Colonias grandes blanco azuladas. β hemólisis	Colonias grandes mucoides, rosa a verde pálido
<i>Corynebacterium spp.</i>	Positivo	Bacilo pleomórfico	Colonias blancas circulares y sobreelevadas. Sin hemólisis.	Sin crecimiento
Hongos	-	-	Aspecto algodonoso sobre-elevado	Sin crecimiento