

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“CORRELACIÓN ENTRE EL DIÁMETRO ESCROTAL Y
CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN EL CABALLO
PERUANO DE PASO EN CUATRO CRIADEROS
DE LA COSTA”**

Presentada por:

EDUARDO JIMÉNEZ ZORRILLA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima - Perú

2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“CORRELACIÓN ENTRE EL DIÁMETRO ESCROTAL Y
CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN EL CABALLO
PERUANO DE PASO EN CUATRO CRIADEROS DE LA
COSTA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

EDUARDO JIMÉNEZ ZORRILLA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Jorge P. Calderón Velásquez
PRESIDENTE

Mg. Sc. Próspero Cabrera Villanueva
ASESOR

Dr. Jorge Aliaga Gutiérrez
MIEMBRO

Mg.Sc. Erickson Ruiz Figueroa
MIEMBRO

Agradezco a nuestro Señor Dios y nuestra madre, la Santa Virgen María, porque todo lo que soy y no soy es porque siempre velan porque siga el mejor camino, el que tienen destinado para mí.

**A mi mami, mi Ashimita, mi hermanito, y a Mine,
quienes son y han sido siempre mi sostén, en toda circunstancia.**

A mi papi y a Nenita, quienes siempre me acompañan, confortan, y velan mi sueño.

**A Marcos y Maricarmen, hermanos que la vida me obsequió, sin los que este trabajo
nunca hubiese sido concebido.**

**A mi familia y mis amigos, quienes siempre me han dado el mejor de los ambientes
para crecer y vivir.**

**A mi Comité Consejero, sin cuya paciencia, consideración e indesmayable apoyo
nunca hubiese llegado a esta etapa.**

A Néstor y Daphne, por ser mis Maestros y modelos a seguir.

**A Javier y Gabriel, quienes me brindaron, como solo ellos pueden hacer, todo el
tiempo y ayuda para conseguir este objetivo.**

A Amalita, por todo su apoyo y sugerencias.

A la Dra. Denise, por ser mi segunda mamá.

A Galy, por extenderme la mano en mi hora menos feliz.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
	2.1. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LOS TESTÍCULOS.....	2
	2.2. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN Y EL GASTO ESPERMÁTICO.....	3
	2.2.1. Estación del año.....	4
	2.2.2. Tamaño testicular.....	5
	2.2.3. Edad.....	7
	2.2.4. Frecuencia de eyaculación.....	9
	2.3. MÉTODO DE COLECCIÓN DE SEMEN.....	11
	2.3.1. Equipamiento.....	11
	2.3.2. Preparación de la vagina artificial.....	13
	2.3.3. Procedimiento para la recolección de semen.....	13
	2.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL.....	14
	2.4.1. Características seminales.....	15
	a. Volumen.....	18
	b. Concentración.....	19
	c. Motilidad.....	20
	d. Vitalidad.....	22
	e. Anormalidades.....	22
	f. Integridad de membrana citoplasmática.....	24
	2.4.2. Tinciones convencionales.....	27
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
	3.1. PROCEDENCIA.....	28
	3.2. METODOLOGÍA.....	29
	3.2.1. Medición de los testículos.....	29
	3.2.2. Colección de semen.....	29
	3.3. EVALUACIÓN SEMINAL.....	30
	3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
	4.1. RESULTADOS GENERALES.....	33
	4.2. CARACTERÍSTICAS.....	35
	4.2.1. DIÁMETRO ESCROTAL.....	35
	4.2.2. CARACTERÍSTICAS SEMINALES.....	35

a. Volumen.....	35
b. Concentración.....	36
c. Motilidad.....	37
d. Vitalidad.....	38
e. Anormalidades.....	38
f. Integridad de membrana citoplasmática.....	38
4.2.3. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE EL DIÁMETRO ESCROTAL Y LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES	39
V. CONCLUSIONES	46
VI. RECOMENDACIONES	47
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VIII. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características anatómicas y reproductivas de los potros	2
Tabla 2: Coeficientes de correlación entre medidas testiculares y características reproductivas	5
Tabla 3: Efecto de la edad en las características seminales y ancho escrotal total.....	8
Tabla 4: Efecto de la frecuencia de eyaculación en los promedios de las características seminales en el potro durante un periodo de colección de 2 a 4 semanas	10
Tabla 5: Efecto de la edad y el número de eyaculaciones en el número total de espermatozoides por eyaculado (10^9)	11
Tabla 6: Rango de características seminales del potro	15
Tabla 7: Promedio y desviación estándar de características seminales del potro	16
Tabla 8: Efecto de la raza en las características seminales y ancho total escrotal en potros	16
Tabla 9: Porcentaje de integridad de la membrana citoplasmática para espermatozoides de potros incubados en soluciones de variado soluto y osmolaridad	25
Tabla 10: Coeficientes de correlación entre la hipo-osmosis, la motilidad progresiva, y otras características seminales en el potro	26
Tabla 11: Localización de los criaderos de los potros Peruano de Paso empleados en el estudio	28
Tabla 12: Medidas de resumen del diámetro escrotal y las características seminales de los 14 potros del estudio	33
Tabla 13: Medidas de resumen del diámetro escrotal y las características seminales de los potros del estudio correspondientes a cada uno de los cuatro criaderos.....	34
Tabla 14: Coeficientes de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Calipers.....	29
Figura 2: Vagina artificial modelo CSU	30
Figura 3: Test de HOS positivo	31
Figura 4: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y el volumen seminal	40
Figura 5: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la concentración seminal	40
Figura 6: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la motilidad espermática.....	41
Figura 7: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la vitalidad espermática	41
Figura 8: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y las anomalías espermáticas.....	42
Figura 9: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la integridad de membrana citoplasmática.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Resultados del diámetro escrotal y características seminales de los 14 potros del estudio60

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo predecir el rendimiento de las características seminales, en potros de la raza Peruano de Paso, por medio de sus correlaciones con el diámetro escrotal. La muestra provino de 14 potros, cuyas edades estaban por encima de los tres años, empleando una vagina artificial para colectar los eyaculados. Se midió el diámetro escrotal, el volumen seminal, la concentración espermática, y los porcentajes de motilidad, vitalidad, anormalidades espermáticas, e integridad de membrana citoplasmática. La estadística descriptiva determinó los siguientes promedios: diámetro escrotal (83.86 mm), volumen seminal (64.29 cc), concentración (91.79 millones/cc), y los porcentajes de motilidad (52.21), vitalidad (77.93), de anormalidades (27.07), e integridad de membrana citoplasmática (61.29). Correlacionando los resultados del diámetro escrotal con el volumen, y los porcentajes de motilidad, vitalidad, anormalidades, e integridad de membrana citoplasmática, se obtuvieron los siguientes valores: -0.060, -0.075, -0.240, -0.405, y -0.056, respectivamente, siendo todos ellos estadísticamente no significativos. Correlacionando los resultados del diámetro escrotal con la concentración espermática, se obtuvo el siguiente valor: +0.684, el cual fue estadísticamente significativo. El diámetro escrotal podría tomarse como un indicador indirecto de la concentración espermática de un potro.

Palabras clave: diámetro escrotal, volumen seminal, vitalidad espermática, concentración espermática, vagina artificial, Peruano de Paso

SUMMARY

The aim of this study was to predict seminal characteristics, in Peruvian Paso stallions, by using their correlations with scrotal width. Sample came from 14 stallions, three years old and up, and ejaculates were taken by using an artificial vagina. Scrotal width, seminal volume, sperm concentration, and motility, vitality, sperm abnormalities and cytoplasmic membrane integrity percentages. Descriptive statistics showed the following averages: scrotal width (83.86 mm), seminal volume (64.29 cc), sperm concentration (91.79 millions/cc), and motility (52.21), vitality (77.93), abnormalities (27.07), and cytoplasmic membrane integrity percentages (61.29). Correlating scrotal width results with seminal volume, and motility, vitality, abnormalities, and cytoplasmic membrane integrity percentages next results were obtained: -0.060, -0.075, -0.240, -0.405, and -0.056, respectively, all of them statistically non-significative. Correlating scrotal width results and sperm concentration percentage following result was obtained: +0.684, which was statistically significant. Scrotal width could be taken like an indirect stallion's sperm concentration percentage indicator.

Keywords: scrotal width, seminal volume, sperm vitality, sperm concentration, artificial vagina, Peruvian Paso

I. INTRODUCCIÓN

El caballo Peruano de Paso constituye parte del patrimonio cultural de nuestra nación, siendo considerado como producto bandera de la misma (Resolución Ministerial N° 381-2012-MINCETUR/DM), y es motivo de orgullo y admiración a nivel mundial.

Es fundamental diseñar programas de reproducción que permitan ampliar el número de ejemplares, en busca de mantener e incluso mejorar las características que han llevado a este caballo a ser considerado, en algún momento, la raza de silla más suave del mundo (Dextre 2019).

El presente trabajo tiene como objetivo utilizar una medida de fácil registro, como es el diámetro escrotal de los potros, como un método indirecto, pero práctico, para la estimación del volumen, concentración espermática, y los porcentajes de motilidad, vitalidad, anormalidades, e integridad de membrana citoplasmática, a través del cálculo de los coeficientes de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales ya mencionadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LOS TESTÍCULOS

Las dimensiones promedio normales de los testículos de los potros son 10 a 12 cm de largo, seis a siete cm de alto, y cinco a seis cm de ancho; y cada uno pesa entre 220 y 300 g (Sisson 1993); en la raza Cuarto de Milla tienen en promedio 215 g, (Gebauer *et al.* 1974a), aunque a los dos años de edad el peso es de 103 g (Naden *et al.* 1990); y en potros de raza Criolla brasilera, a los cuatro años de edad, es de 163 g (Figueiró 2010). En algunos estudios se ha reportado que el testículo izquierdo es más pesado que el derecho (Gebauer *et al.* 1974a), y de mayor tamaño (Paccamonti *et al.* 1999), pero en otros estudios no se ha encontrado diferencias significativas entre ambos (Parlevliet *et al.* 1994).

En la Tabla 1 se pueden apreciar las mediciones de algunas características anatómicas y reproductivas de los potros:

Tabla 1: Características anatómicas y reproductivas de los potros

Características	Media \pm Desviación estándar
Medidas	
Ancho escrotal total (mm)	102 \pm 9.9
Ancho del testículo izquierdo (mm)	58 \pm 5.2
Ancho del testículo derecho (mm)	56 \pm 5.8
Longitud del testículo izquierdo (mm)	103 \pm 8.2
Longitud del testículo derecho (mm)	108 \pm 8.0
Peso del parénquima (g)	328 \pm 104.0

n = 43

FUENTE: Thompson *et al.* (1979)

Podemos apreciar que si bien lo que señala Paccamonti *et al.* (1999) se ve en el caso del ancho de los testículos, no es así para el caso de la longitud de los mismos.

En cuanto al diámetro escrotal, hay varios estudios que consigan los siguientes promedios para esta característica: 102 ± 9.9 mm (McKinnon y Voss 1993), 105 ± 8.5 mm (Muñoz-Alonso *et al.* 2016), 108 mm (DE 12 mm) (Pickett *et al.* 1988), y 120 mm (Sisson 1993).

Asimismo, en un trabajo realizado con diversas razas se hallaron los siguientes promedios: American Paint Horse: 102 mm (DE 12 mm), Appaloosa: 103 mm (DE 7 mm), Cuarto de Milla: 106 mm (DE 11 mm), Árabe: 107 mm (DE 13 mm), y Pura Sangre Inglés: 111 mm (DE 11 mm) (Pickett *et al.* 1988).

En otro estudio hecho con potros de razas ligeras se encontró que la edad afecta significativamente las medidas testiculares (las mediciones de los animales de siete años a más fueron mayores que las de los animales más jóvenes). El diámetro escrotal promedio para los ejemplares entre dos y tres, cuatro a seis, y de siete a más años, fue de 96, 100, y 109 mm, respectivamente (Thompson *et al.* 1979).

Los testículos son ovales, lisos, con el borde externo regular y algo turgente, de textura elástica, y se puede saber su posición en el escroto palpando el epidídimo. El ligamento caudal del epidídimo se mantiene palpable en el adulto como un pequeño (uno a dos cm) anexo junto a la cola del epidídimo, el cual está unido al polo caudal del testículo (Hafez 1989). El cordón espermático puede palparse a través del cuello del escroto, y va desde el anillo inguinal hasta su unión con los testículos, y sirve como un pasaje para el ducto deferente, nervios y vasos sanguíneos asociados con los testículos (McKinnon y Voss 1993).

2.2. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN Y EL GASTO ESPERMÁTICO

La Producción Espermática Diaria (PED) es la cantidad de espermatozoides producidos por el potro al día, y el Gasto Espermático Diario (GED) es el número de espermatozoides disponibles para la eyaculación cuando el potro es colectado una vez al día luego que las reservas extragonadales han sido estabilizadas (removidas a través de la eyaculación frecuente).

Los principales factores que afectan la producción y el gasto espermático son: estación del año, tamaño testicular, edad y frecuencia de eyaculación; todos ellos están interrelacionados.

2.2.1. Estación del año

El potro y la yegua tienen ambos comportamiento sexual estacional. Normalmente los cambios en las características seminales y la libido del potro coinciden con la estación normal de apareamiento de las yeguas; sin embargo, el estro puede ser inducido en las yeguas, durante la etapa de anestro, usando iluminación artificial.

Exponiendo a las yeguas a 16 horas de luz/día desde el inicio o la mitad de diciembre (en el hemisferio norte), se las estimula a establecer un ciclo estral normal desde temprano en la estación de apareamiento, produciendo crías tempranamente (López *et al.* 2010). Se ha reportado también el efecto de la estación en las características seminales del potro, tales como el tamaño y peso testicular (Johnson y Thompson 1983; Burns *et al.* 1984), la producción y gasto espermático (Skinner y Bowen 1968; Berndtson *et al.* 1983), y su deseo sexual (Thompson *et al.* 1977). Con respecto al efecto de la iluminación artificial en la función reproductiva del potro, se reporta que al exponerlos a periodos de 16 horas de luz/día (por 9 a 13 semanas) hay un aumento en el ancho escrotal, luego de lo cual vuelve a decrecer por fotorefractoriedad (Clay *et al.* 1987); los efectos de la estación del año son mayores sobre el plasma seminal que sobre los espermatozoides. Los espermatozoides del primer eyaculado son menos afectados por la estación que los del segundo, en la mayor parte de las características del semen (McKinnon y Voss 1993). Otros estudios indican que tanto el volumen del eyaculado como el conteo de espermatozoides y la motilidad se incrementan en la época de mayor luminosidad (Schmidt *et al.* 2017).

En un estudio realizado en potros Cuarto de Milla, en el hemisferio norte, el volumen promedio de la fracción libre de gel y el volumen seminal total fue marcadamente influenciado por la estación, pero la mayor parte de la diferencia entre el primer y segundo eyaculados fue a causa del gran volumen de gel en el primer eyaculado. El número de espermatozoides por eyaculado y el gasto espermático también fueron menores al inicio de la estación reproductiva (McKinnon y Voss 1993).

En otras razas, siempre en el hemisferio norte, tales como el Dutch Warmblood (Janett *et al.* 2003a), o incluso en los Ponies (Magistrini *et al.* 1987) también se ha registrado un menor volumen seminal en el invierno. Vásquez (2019), en un estudio hecho en la raza Peruano de Paso, encontró que en la primavera hay mayor volumen de eyaculado que en el invierno (52.66 cc y 41.11 cc, en promedio, respectivamente).

Hay reportes que indican que hay una mayor producción de espermatozoides/día alrededor de la primavera (Blanchard 1996). Asimismo, se reportan mayores índices de fertilidad y preñez en el segundo semestre en nuestro país (Horruitiner 2000). Esto puede deberse a un mejor acondicionamiento del sistema reproductor tanto del potro como de la yegua. De modo general, parámetros como la concentración espermática y la motilidad también muestran menor calidad en el invierno (Gamboa *et al.* 2010); sin embargo, otro estudio muestra que la motilidad progresiva, tanto en el primer como segundo eyaculados, no se afecta con la estación (Pickett 1995).

2.2.2. Tamaño testicular

El tamaño testicular está altamente correlacionado con la producción y el gasto espermático diarios (PED y GED, respectivamente).

En la Tabla 2 se pueden ver algunos coeficientes de correlación al respecto:

Tabla 2: Coeficientes de correlación entre medidas testiculares y características reproductivas

Medida	Peso parenquimal	PED	GED
Ancho escrotal total	+0.83	+0.75	+0.55
Ancho del testículo izquierdo	+0.82	+0.68	+0.50
Ancho del testículo derecho	+0.82	+0.76	+0.61
Longitud del testículo izquierdo	+0.57	+0.52	+0.34
Longitud del testículo derecho	+0.61	+0.59	+0.50

n = 43, PED: Producción Espermiática Diaria, GED: Gasto Espermiático Diario

FUENTE: Thompson *et al.* (1979)

Podemos apreciar que el mayor coeficiente de correlación encontrado fue entre el ancho escrotal total (AET) y el peso del parénquima (+0.83). En general, los coeficientes de correlación son más altos para los casos en que está involucrado el ancho testicular en comparación a los valores observados cuando se involucra el largo testicular (McKinnon y Voss 1993). Thompson *et al.* (1979), encontraron una correlación de +0.75 entre el largo escrotal total y el peso del parénquima testicular, y de +0.83 entre el largo escrotal total y la PED. En un estudio en la raza Cuarto de Milla, la correlación entre el PED y el GED fue de +0.83 (Naden *et al.* 1990). Del mismo modo, Kavak (2004) reportó una correlación de +0.72 entre la circunferencia escrotal y el GED, en potros de raza Estonia, y de +0.67, en potros de raza Tori. Asimismo, en otro estudio se encontró una correlación de +0.80 entre el GED y la PED, y una correlación de +0.77 entre la PED y el peso testicular (Gebauer *et al.* 1974b). Vásquez (2019) encontró, en la raza Peruano de Paso, una correlación del +0.189 entre el volumen testicular y el volumen del eyaculado, en invierno, y de +0.374 en primavera. El tamaño testicular también está relacionado a otros parámetros, tales como el tamaño corporal (Kavak *et al.* 2003).

El método más preciso de medición del tamaño testicular es el examen ultrasonográfico transescrotal (Love 1992), aunque comúnmente se usa el vernier escrotal (calipers) para medirlos (Muñoz-Alonso *et al.* 2016). Los testículos de un potro maduro y fértil miden generalmente 8.5 a 11 cm de largo, 4.5 a 6 cm de ancho, y 5 a 6.5 cm de alto; en estos potros, el ancho escrotal total es generalmente de 9.5 a 11.5 cm (Blanchard 1996). Se ha observado que estas medidas son mayores en potros castrados unilateralmente (Muñoz-Alonso *et al.* 2016). Naden *et al.* (1990) encontraron que el ancho escrotal de un testículo, en potros Cuarto de Milla, a los dos años de edad, es de 46.3 ± 1.1 mm, y que el peso es de 103.0 ± 6.3 g. También se señala que el crecimiento testicular continúa hasta los cuatro a cinco años (Roser 2000), hasta los cinco años de edad (Naden *et al.* 1990), seis años (Thompson *et al.* 1979; Pickett *et al.* 1982), o hasta pasados los 10 años (Stout y Colenbrander 2011). En los estudios de biometría testicular no se usa el perímetro escrotal, debido a la posición horizontal de los testículos, y se usan variantes, tales como el largo o el ancho escrotal total, entre otros (Varner *et al.* 1991a). Pickett (1993a) encontró que si el largo escrotal es menor a ocho cm los espermiogramas no muestran características satisfactorias.

El número de espermatozoides en los eyaculados de potros que sirven una vez al día luego de la estabilización de las reservas espermáticas extragonadales es el número total de espermatozoides disponibles para todas las yeguas a ser cubiertas en un día dado. Esto sirve para estimar el número de yeguas que el potro puede cubrir al día., asumiendo que tiene la suficiente libido y que las montas están convenientemente distribuidas durante el día. Sin embargo, se debe ser cauto al usar el GED estimado sobre la base del volumen testicular para determinar el número de yeguas que un potro puede cubrir al día, ya que este método asume que los testículos están produciendo espermatozoides en la tasa normal (alrededor de 16 millones de espermatozoides/g de parénquima testicular), y no necesariamente podría ser ese el caso. El método más preciso para determinar el actual GED es colectar semen diariamente por cinco a siete días luego que las reservas espermáticas extragonadales han sido estabilizadas, y luego determinar el número de espermatozoides presentes en los eyaculados colectados diariamente. El GED varía con la estación, llegando al máximo durante el verano y al mínimo en el invierno. La eficiencia de la producción espermática es el número de espermatozoides producidos por día por gramo de tejido testicular (Youngquist 1997).

El número de espermatozoides que un animal puede producir depende en gran parte de la cantidad de tejido testicular funcional. El tamaño testicular es importante para la selección de un potro, asumiendo que la consistencia testicular sea satisfactoria (firme y uniforme). Las medidas testiculares se usan para estimar la producción y el gasto espermático, y predecir cuantas yeguas pueden ser servidas (Blanchard 1996). Debe considerarse también la consistencia o tono del tejido testicular. El tono debe ser entre firme y rígido. Una dureza o firmeza excesivas podrían ser indicativos de algún problema (Chenier 2007).

2.2.3. Edad

Parlevliet *et al.* (1994) indican que los potros deben ser usados cuando superen los 34 meses de edad. En un estudio realizado en potros Cuarto de Milla se encontró que, a los dos años de edad, la PED es de 1.7×10^9 espermatozoides, y el GED es de 1.1×10^7 espermatozoides (Naden *et al.* 1990).

Ellos consideran que la pubertad se alcanza cuando el potro produce el primer eyaculado con 50×10^6 espermatozoides, con ≥ 10 por ciento de motilidad (aproximadamente entre las 56 y 97 semanas de vida). En otro estudio, en potros criollos, se encontró que al aumentar la edad se incrementan el volumen testicular, el número de túbulos seminíferos y el de espermatozoides en los túbulos (Weber 2012). Vásquez (2019), en potros Peruanos de Paso, halló que el volumen del eyaculado se incrementa con la edad (trabajó con dos grupos etarios: de cuatro a siete años, y de ocho a 10 años).

En la Tabla 3 podemos apreciar el efecto de la edad sobre las características seminales y el ancho escrotal total:

Tabla 3: Efecto de la edad en las características seminales y ancho escrotal total

Edad	Volumen seminal		Espermatozoides			Ancho escrotal total (cm)	
	Gel (cc)	Total (cc)	Concentración (10^6 /cc)	Total (10^9)	Motilidad (porcentaje)		Normales (porcentaje)
2 años							
Media	2	29	328	6.8	51	49	96
DE	5	19	191	3.9	16	15	9
3 años							
Media	3	37	309	8.8	53	52	101
DE	8	23	179	4.9	14	15	8
4 años							
Media	8	49	321	10.2	57	54	104
DE	18	36	198	7.1	11	14	11
5 años							
Media	10	55	374	12.2	53	53	108
DE	17	38	263	7.2	16	14	11
6 años							
Media	14	58	339	11.7	52	51	107
DE	37	50	216	7.4	16	17	12
7 años							
Media	11	60	290	11.5	51	53	109
DE	23	42	147	6.4	15	15	11
8 años							
Media	5	57	394	14.1	57	52	109
DE	12	40	424	8.4	17	18	12
9 años							
Media	8	57	387	14.5	56	49	109
DE	15	42	260	7.6	14	15	12
10 años							
Media	10	60	299	13.6	55	50	111
DE	17	34	148	7.8	13	14	9

DE: desviación estándar

FUENTE: Pickett *et al.* (1988)

Podemos ver que el volumen seminal se incrementa hasta los seis años (en el caso de la fracción de gel), y hasta los siete años en caso del volumen total.

Entre los cinco y ocho años es el periodo de mayor concentración espermática, entre los cinco y nueve años es el de mayor número total de espermatozoides por eyaculado, entre los cuatro y ocho años el de mayor porcentaje de motilidad, entre los cuatro y siete años el de mayor porcentaje de anormalidades, y el ancho escrotal total de incrementa conforme aumenta la edad del potro.

El número de espermatozoides y la calidad de estos determinan la fertilidad relativa de un eyaculado; el número de espermatozoides disponibles por eyaculación depende de las reservas en la cola del epidídimo, ducto deferente y ámpula (los espermatozoides en la cabeza del epidídimo no están disponibles para la eyaculación); el número de espermatozoides disponibles para la eyaculación está profundamente influenciado por el intervalo entre eyaculaciones, el tamaño testicular y la edad (McKinnon y Voss 1993), así como la estación del año (Díaz 2010).

En un estudio se encontró que las reservas espermáticas de potros descansados se incrementan con la edad. Sin embargo, este incremento no fue significativo para la cabeza del epidídimo. El tamaño testicular y la producción espermática diaria también se incrementan con la edad (McKinnon y Voss 1993). Thompson *et al.* (1979), encontraron un coeficiente de correlación entre el diámetro escrotal y la edad de +0.64.

En cuanto a la relación entre el incremento del diámetro escrotal y la edad, se ha encontrado, en un estudio hecho en la raza Mangalarga Marchador, que hay diferencias significativas en grupos etarios de entre dos a tres años, cuatro a seis años, y de siete años a más edad (Coelho *et al.* 2015).

2.2.4. Frecuencia de eyaculación

Cuando la frecuencia de eyaculación aumenta, el número de espermatozoides/eyaculación decrece (Sullivan y Pickett 1975). Si el manejo sexual del potro es demasiado intenso, la fertilidad podría declinar debido a un sobre-uso, sobre todo al inicio de la estación de montas.

La libido también puede ser un factor limitante al comienzo de la estación de montas, y hacia el final de la temporada, cuando el potro está sexualmente saciado (Blanchard 1996).

En la Tabla 4 se puede apreciar el efecto de la frecuencia de eyaculación sobre las características seminales del potro:

Tabla 4: Efecto de la frecuencia de eyaculación en los promedios de las características seminales en el potro durante un periodo de colección de 2 a 4 semanas

Característica	Frecuencia de eyaculación por semana		
	1 vez	3 veces	6 veces
Volumen/eyaculado (cc)			
Gel	18	8	6
Fracción sin gel	47	56	51
Total	65	64	57
Espermatozoides			
Concentración (10^6 /cc)	288	248	142
Total/eyaculado (10^9)	11.4	11.7	5.9
Total/semana (10^9)	11.4	35.2	35.3
Motilidad (porcentaje)	54	52	56

FUENTE: Pickett *et al.* (1975)

En cuanto al volumen seminal, la fracción de gel y el volumen total se reducen conforme se incrementa la frecuencia de eyaculaciones. Es llamativo que en el caso de la fracción sin gel su volumen se incrementa con el aumento de la frecuencia eyaculatoria, aunque decrece si dicha frecuencia continúa aumentando. De otro lado, un comportamiento similar al anterior es el que se aprecia en el caso del número total de espermatozoides por eyaculado, y un comportamiento inverso en el caso del porcentaje de motilidad (inicialmente decrece y luego crece, conforme se incrementa la frecuencia eyaculatoria). En el caso de la concentración espermática, esta decrece conforme aumenta la frecuencia de eyaculaciones.

Asimismo, en la Tabla 5 se aprecia el efecto combinado de la edad y el número de eyaculaciones en el número total de espermatozoides por eyaculado:

Tabla 5: Efecto de la edad y el número de eyaculaciones en el número total de espermatozoides por eyaculado (10^9)

Número de eyaculados	Edad (años)		
	2 a 3 (n=7)	4 a 6 (n=16)	9 a 16 (n=21)
1	4.5	9.5	11.4
2	2.4	3.5	5.5
3	0.9	2.6	2.4
4	0.6	1.3	1.8
5	0.5	1.1	1.2

FUENTE: Squires *et al.* (1979)

En todos los grupos etarios se observa una disminución en el número total de espermatozoides por eyaculado conforme se incrementa la frecuencia eyaculatoria. Asimismo, se ve un incremento del número total de espermatozoides por eyaculado conforme aumenta la edad, excepto para el caso en que se toman tres eyaculados, ya que hay un incremento hasta el grupo etario entre los cuatro y seis años, después de lo cual hay una disminución conforme los potros avanzan en edad.

2.3. MÉTODO DE COLECCIÓN DE SEMEN

2.3.1. Equipamiento

El método más común para la colección de semen es el uso de una vagina artificial (Yates y Whitacre 1993). Por lo general, la vagina artificial tiene una estructura externa y un forro interno de látex. Entre la caja externa y el forro interno se infunde agua tibia, y en algunos casos aire, para proveer la presión y temperatura adecuadas para la colección. El recipiente para la colección se coloca en el extremo del forro para recibir el eyaculado. Hay una gran variedad de modelos de vaginas artificiales comercialmente disponibles (Forney y McDonnell 1999). La mayoría de los modelos de vagina artificial cuentan con un filtro de gel que se coloca en el forro interno; este reducirá la mezcla de la fracción rica en espermatozoides con la fracción gelatinosa, y reducirá el número de espermatozoides en el gel descartado. También existen forros plásticos descartables (Pickett *et al.* 1976).

El modelo Missouri o Nasco tiene un forro de látex de doble pared, con una cámara de agua sellada y una caja externa portátil de cuero. La cámara de agua está equipada con una válvula de goma para permitir el ajuste de la presión, ya sea con agua o aire (Yates y Whitacre 1993). A menudo, durante la colección, el glande del pene se extiende más allá de la cámara de agua. Así, con esta vagina artificial es menos probable que los espermatozoides sean dañados por altas temperaturas. Este modelo es económico, liviano y es de fácil manejo (Hurtgen 2009).

El modelo japonés, o Nishikawa, está compuesto por una caja externa de aluminio y un forro de látex. Sus componentes la hacen muy liviana y de fácil manejo. El forro debe estar firmemente sellado alrededor del extremo terminal de la vagina para prevenir el goteo de agua dentro del receptáculo de colección. En el extremo terminal también hay un bulbo de goma, para la colección del eyaculado, y una cubierta protectora. También se puede usar una almohadilla anillada de espuma de goma, a fin de ejercer presión contra el glande y producir la estimulación necesaria durante la penetración (Brinsko *et al.* 2011). Este modelo también tiene una válvula de escape para permitir la expulsión del exceso de agua (Yates y Whitacre 1993).

Los modelos Colorado, Lane y CSU son muy parecidos entre sí. Cuentan con una caja de plástico externa de gran tamaño y dos forros internos de látex independientes. El primer forro es introducido a través de la caja y asegurado sobre el extremo distal para formar la cámara de agua entre el forro y la caja. El forro interno es colocado dentro del primero y es asegurado a la caja en un extremo. El extremo opuesto del segundo forro está unido al recipiente de semen (Blanchard *et al.* 2003). Este sistema de forros dobles reduce la posibilidad que el eyaculado se contamine con agua. Una cubierta aislada protege la botella recolectora de la luz solar y de la temperatura ambiental (Yates y Whitacre 1993). Debido a la gran cantidad de agua que este modelo emplea, se hace más dificultoso su manejo. No obstante, proveen muy buen calor de retención (Serres 2012).

El modelo Roanoke tiene una caja plástica corta y un forro simple de látex, ensamblados de forma similar al modelo japonés, con la bolsa plástica colectora ubicada al final de la caja (Yates y Whitacre 1993). Este modelo es muy útil para la colección de semen de potros pequeños (Dascanio y McCue 2014).

Otra forma de colección de semen es usando preservativos, como en los casos de potros que no sirven en vaginas artificiales; sin embargo, no todos los potros los aceptan. El preservativo debe recuperarse inmediatamente después del servicio para prevenir su pérdida, a medida que el pene vuelve a su tamaño normal (Yates y Whitacre 1993). El semen, en estos casos, está más contaminado con bacterias y detritos que el colectado con vagina artificial, por lo cual el uso de los preservativos solo se reserva para casos como los antes mencionados (England 2008).

2.3.2. Preparación de la vagina artificial

Una vez armada, la vagina artificial debe llenarse con agua a una temperatura que va de 44 a 54 °C (Hillman *et al.* 1980). Al momento previo a la colección, la superficie interna de la vagina artificial debe recubriese con un lubricante estéril, evitando aquellos que son bacteriostáticos, ya que pueden resultar también espermicidas. La presión de la vagina artificial debe ser suficientemente alta como para permitir el contacto y la estimulación del pene, pero no dificultar la penetración o expansión del miembro a su estado de erección plena (Varner 1986). El grado de presión necesaria de la vagina artificial para la colección puede variar entre los diversos potros, por lo cual conviene llevar un registro de la misma para cada uno de ellos (Yates y Whitacre 1993).

2.3.3. Procedimiento para la colección de semen

Previamente a la colección, el pene en erección es lavado para disminuir la contaminación del semen con bacterias y detritos de la superficie peniana. Algunos investigadores reportan que lavar diariamente el pene con jabón blanco puede reemplazar la flora normal por patógenos potenciales. Otros investigadores hallaron que también el agua sola reduce la carga bacteriana del pene tan eficientemente como el jabón (Jones *et al.* 1984). La aplicación de jabón blanco, seguido por un enjuague total, debe limitarse a casos en que haya gran cantidad de esmegma. Luego el pene debe ser secado, hacer la colección inmediatamente a fin de prevenir la re-contaminación del pene (Yates y Whitacre 1993). No se observan ventajas cuando se estimula sexualmente al potro más allá del grado necesario para el lavado peniano.

Una vez listo, el potro monta una yegua en estro, o un maniquí. En el primer caso, el pene se desvía a un lado y se le dirige hacia la vagina artificial. Los potros que tienen dificultades en montar porque tienen problemas en los miembros posteriores, pueden montar con mayor facilidad a una hembra simulada, de baja alzada (Brinsko *et al.* 2011). El uso de maniqués reduce la variabilidad de las condiciones entre las colecciones. Los maniqués evitan que se produzcan lesiones por la monta en la hembra (Hurtgen 2009). Si el maniquí es de altura ajustable, se puede acomodar a potros de diferente alzada. La mayoría de los potros pueden ser entrenados para montar maniqués. Por lo general, la colocación de una yegua en estro, cerca del maniquí, es suficiente para estimular al potro en su primera monta. Una vez que el macho asocia el maniquí con la monta, la yegua ya no será necesaria (Yates y Whitacre 1993).

Cuando termina la eyaculación, el recipiente colector debe ser bajado para permitir el flujo rápido del semen dentro del recipiente. El semen expuesto a temperaturas superiores a 49 °C disminuirá la motilidad de los espermatozoides (Hillman *et al.* 1980); por lo tanto, es importante que los potros eyaculen cerca del final de la vagina artificial, de manera tal que el semen fluya rápidamente dentro del recipiente colector. Después de la colección, la presión en la vagina artificial se reduce para posibilitar que el semen remanente que haya quedado atrapado entre las paredes del forro drene dentro del recipiente colector. El coleccionado seminal se transporta rápidamente al laboratorio, evitando los cambios de temperatura y el efecto de la luz solar, que tienen acción espermicida (Yates y Whitacre 1993).

2.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

El semen se compone de espermatozoides y plasma seminal, el cual posee componentes beneficiosos para el espermatozoide; sin embargo, no es el medio idóneo para almacenar espermatozoides. Su efecto perjudicial puede ser contrarrestarse separando la fracción rica en espermatozoides del eyaculado usando filtros al momento de la colección, o centrifugando el eyaculado después de esta (Brinsko 2000).

La predicción de la fertilidad potencial del eyaculado basada en el examen de los parámetros de rutina del semen es riesgosa; no obstante está bastante correlacionada con la motilidad progresiva y, en menor grado, con la morfología del espermatozoide.

2.4.1. Características seminales

Cuando el semen llega al laboratorio debe separarse la fracción de gel, si no se hubiese utilizado un filtro al momento de la colección. Para evitar que la muestra se dañe, todo el equipo que entre en contacto con ella debe ser previamente entibiado a la temperatura corporal (McKinnon y Voss 1993).

En la Tabla 6, Sánchez (1992) presenta los rangos hallados por varios autores para diversas características seminales:

Tabla 6: Rango de características seminales del potro

Autor	Volumen (cc)	Concentración (x 10⁶/cc)	Motilidad progresiva (porcentaje)	Vitalidad (porcentaje)	Anormalidades (porcentaje)
Díaz y Arancibia (1971)	72.3-49.9	272-214	-	57.6	33.0-10.0
Heyne (1979)	42.8-23.8	401-211	61.4-18.0	-	19.3-9.1
Pérez-Sampallo (1980)	49.3-28.5	403-248	69.4-9.1	-	16.9-6.0
De los Reyes (1983)	62.6-32.6	270-301	51.8-23.8	-	21.9-5.8
Rodríguez (1986)	96.0-53.0	161-111	43.0-21.5	69.5-13.5	27.0-17.0
Hernández (1987)	40.1-50.5	537-260	62.3-4.5	-	-
Jordán (1988)	75.5-23.5	153-129	60.5-189.0	74.8-8.9	-
Sánchez (1991)	44.1-27.3	347-200	68.2-6.1	69.0-4.3	20.8-2.7

FUENTE: Sánchez (1992)

Asimismo, en la Tabla 7 se muestra el promedio y desviación estándar de varias de las características seminales:

Tabla 7: Promedio y desviación estándar de características seminales del potro

Variable	Promedio y desviación estándar
Volumen Seminal (cc)	
Gel	10 ± 23
Total	54 ± 42
Espermatozoides	
Concentración (10 ⁶ /cc)	335 ± 232
Total x eyaculado (10 ⁹)	11.9 ± 9.0
Motilidad (porcentaje)	53 ± 15
Morfología (porcentaje)	
Normales	51 ± 15
Anormales	
Cabeza	9 ± 8
Pieza media	11 ± 11
Cola	20 ± 13
Otras	0.14 ± 1

FUENTE: Pickett *et al.* (1988)

En la Tabla 8 se aprecia el efecto de la raza en las características seminales y el ancho escrotal total:

Tabla 8: Efecto de la raza en las características seminales y ancho total escrotal en potros

Raza	Volumen seminal		Espermatozoides				Ancho escrotal total (cm)
	Gel (cc)	Total (cc)	Concentración (10⁶/cc)	Total (10⁹)	Motilidad (porcentaje)	Normales (porcentaje)	
Cuarto de Milla							
Media	12	55	309	10.7	55	53	106
DE	29	41	248	7.5	13	15	11
Pura Sangre Inglés							
Media	7	52	364	13.0	52	48	111
DE	21	39	227	6.4	15	14	11
Árabe							
Media	10	49	367	11.6	53	54	107
DE	20	37	221	7.4	17	16	13
Appaloosa							
Media	5	43	350	10.3	56	52	103
DE	11	33	245	5.0	14	15	7
Paint Horse							
Media	8	42	299	8.5	53	55	102
DE	23	36	148	5.4	14	14	12

DE: desviación estándar

FUENTE: Pickett *et al.* (1988)

En cuanto al volumen seminal, tanto para la fracción de gel como para el volumen total, vemos que hay variación entre las razas consideradas. Una situación similar es la que se aprecia tanto para la concentración espermática como para el número total de espermatozoides por eyaculado. En el caso de los porcentajes de motilidad y normales la magnitud de la variación entre las razas es menos patente, siendo algo mayor en el caso de esta última característica, y en cuanto al ancho escrotal total hay algo de variación entre las razas involucradas.

Si la muestra de semen es muy gruesa, los espermatozoides están en capas y la motilidad no puede ser estimada convenientemente (las muestras con una gran concentración son juzgadas usualmente como muestras que tienen alta motilidad). El semen debe extenderse a 25 ó 50 millones de espermatozoides/cc, evitando los dilutores que puedan influenciar en la motilidad. La temperatura del portaobjeto debe ser controlada (37 °C) usando una platina caliente; la profundidad de la suspensión en la lámina debe ser estandarizada, y se debe examinar varios campos cerca al centro de la lámina. La motilidad de los extremos declina más rápidamente que la del centro como resultado de la desecación y la exposición al aire. Se han encontrado bajas correlaciones entre fertilidad y porcentaje de mótilos (+0.40), y fertilidad y motilidad progresiva (+0.46) (Jasko 1992). Una muy baja motilidad podría ser un indicador para no usar determinado semen, pero una buena motilidad no necesariamente indica que se ha mantenido la capacidad fertilizante de un potro (Katila 2001).

Hay varios estudios en los que se han determinado coeficientes de correlación entre diferentes características seminales: +0.50 a +0.70 entre el porcentaje de motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales (Pickett *et al.* 1988); +0.51 entre el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática y el porcentaje de motilidad (Neild *et al.* 1999), -0.186 y +0.75 entre el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática y el porcentaje de espermatozoides normales (Alierta *et al.* (1999) y Neild *et al.* (1999), respectivamente), y -0.195 y -0.297 entre el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática y el porcentaje de espermatozoides vivos, y entre el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de espermatozoides vivos, respectivamente (Alierta *et al.* 1999).

a. Volumen

Entre los estudios que reportan registros de volumen seminal, están los siguientes: Pickett *et al.* (1988): 54 cc, con DE de 42 cc; Nishikawa (1959): 58 cc, en la etapa no reproductiva; Bielanski (1951), quien trabajó con 609 muestras procedentes de 305 potros, encontrando una media de 66 cc; MacLeod y McGee (1950), quienes tomaron 35 muestras de 23 potros, encontraron un volumen medio de 73 cc; Rodríguez y Bustos-Obregón (1996): 115 ± 69 cc, en la etapa reproductiva; y Nishikawa (1959), quien encontró una media de 130 cc, con un rango entre 10 y 450 cc, en la etapa reproductiva.

En cuanto a las diferencias entre razas, se hallaron los siguientes promedios: American Paint Horse: 42 cc (DE 36 cc), Appaloosa: 43 cc (DE 33 cc), Árabe: 49 cc (DE 37 cc), Pura Sangre Inglés: 52 cc (DE 39 cc), y Cuarto de Milla: 55 cc (DE 41 cc) (Pickett *et al.* 1988). Asimismo, en otros estudios hechos en potros Peruano de Paso, Aznarán (2019) registró un promedio de 56 cc, y Vásquez (2019) encontró una media de 41 cc (DE 7.8 cc), en invierno, y 56 cc (DE 8.39), en primavera. De otro lado, en un estudio realizado en potros de raza Chilote (criollo chileno), el que el volumen fue en promedio de 2.1 cc, con un rango entre 1.2 y 7 cc (Cox 2005). Dowsett y Knott (1996) indican que el volumen del eyaculado tiene una relación directa con el tamaño de los potros (raza).

Comparando potros que realizan distintas actividades, se encontró en ejemplares de salto con obstáculos, fuera de competencia: 47 cc (rango de 19 a 187 cc); en ejemplares de concurso completo (doma clásica, salto a campo traviesa, y salto con obstáculos): 48 cc (rango de 15 a 130 cc); en ejemplares de doma clásica: 57 cc (rango de 17 a 185 cc); y en ejemplares de salto con obstáculos, en actividad, un promedio de 64 cc (rango de 1 a 290 cc) (Wilson *et al.* 2019).

El volumen del eyaculado por sí solo no es importante para la fertilidad. El número total de espermatozoides en el eyaculado determina cuántas yeguas pueden ser inseminadas. La determinación del volumen libre de gel del eyaculado es necesaria para calcular el número total de espermatozoides por eyaculado. Este depende de la raza, la edad y el ambiente, principalmente (Hafez 1989).

Entre los factores ambientales están las condiciones de albergue, la alimentación, estación del año, método y frecuencia de colección, entre otros. En general, las especies con eyaculación intrauterina (como el equino y el porcino), tienen un mayor volumen que las especies con eyaculación intravaginal. El volumen seminal debe determinarse en términos de fracción libre de gel, la cual representa la mayor parte de la fracción rica en espermatozoides, y la fracción pre-eyaculatoria libre de espermatozoides, secretada por las glándulas uretral y bulbouretral, así como la fracción de gel producida por las glándulas seminales. De preferencia, el volumen debe ser medido en un cilindro estéril pre-calentado.

b. Concentración

Entre los valores promedio de concentración reportados están los siguientes: 95 millones/cc (MacLeod y McGee 1950), 120 millones/cc (rango de 39 a 820 millones/cc), en la etapa reproductiva, y 147 millones/cc, en la etapa no reproductiva (Nishikawa 1959), 155 ± 132 millones/cc, en la etapa reproductiva (Rodríguez y Bustos-Obregón 1996), 325 millones/cc (DE 232 millones/cc) (Pickett *et al.* 1988), y 388 millones/cc (Bielanski 1951).

En cuanto a las diferencias entre razas, los promedios hallados para varias de ellas son los siguientes: American Paint Horse: 304 millones/cc (DE 191 millones/cc), Cuarto de Milla: 309 millones/cc (DE 248 millones/cc), Appaloosa: 350 millones/cc (DE 245 millones/cc), Pura Sangre Inglés: 364 millones/cc (DE 227 millones/cc), y Árabe: 367 millones/cc (DE 221 millones/cc) (Pickett *et al.* 1988). En otro estudio hecho en potros Peruano de Paso, el promedio hallado por Aznarán (2019) fue: 216.8 millones/cc (DE 4.3 millones/cc).

Comparando potros dedicados a diversos tipos de actividades, se señalan los siguientes: para ejemplares de salto con obstáculos, en actividad: 165 millones/cc (rango de 1 a 550 millones/cc); ejemplares de doma clásica: 200 millones/cc (rango de 42 a 632 millones/cc); ejemplares de concurso completo: 225 millones/cc (rango de 11 a 543 millones/cc); y ejemplares de salto con obstáculos, fuera de competencia: 470.5 millones/cc (rango de 301 a 852 millones/cc) (Wilson *et al.* 2019).

Hay estudios que muestran una mayor concentración espermática en el verano (Pickett *et al.* 1976; Jasko *et al.* 1991); sin embargo, en un estudio realizado con ejemplares de la raza Franches-Montagnes se encontró una mayor concentración en el invierno (Janett *et al.* 2003b).

La concentración espermática puede ser medida con un hemocitómetro o un espectrofotómetro. El espectrofotómetro, con una curva estándar preestablecida, provee una medida indirecta de la concentración basada en el porcentaje de transmisión de la luz a través de la muestra, pero que puede estar afectada por células o detritos en la muestra que bloquean la transmisión lumínica (Rigby *et al.* 2001). También hay aparatos contadores de espermatozoides que trabajan con el mismo principio que el espectrofotómetro, pero que está específicamente diseñado para determinar la concentración del espermatozoides (Hafez 1989).

Se reporta que la concentración espermática está muy influenciada por el intervalo entre eyaculaciones, el tamaño testicular y la edad (Metcalf *et al.* 1997). Sin embargo, Aznarán (2019), en un estudio en potros Peruano de Paso, señala que el volumen testicular, el volumen del eyaculado y la edad no influyen en la concentración espermática.

c. Motilidad

Hay varios reportes sobre el porcentaje de motilidad en potros: 42 ± 25 por ciento, en la etapa reproductiva, y 44 ± 18 por ciento, en la etapa no reproductiva (Rodríguez y Bustos-Obregón 1996), 53 por ciento (DE 15 por ciento) (Pickett *et al.* 1988), 58 por ciento (McKinnon y Voss 1993), 67 por ciento (Bielanski 1975), 80 por ciento (rango de 15 a 90 por ciento) en la etapa reproductiva, y de 82 por ciento, en la etapa no reproductiva (Nishikawa 1959).

En cuanto a las diferencias entre razas, se reportan los siguientes promedios: Pura Sangre Inglés: 52 por ciento (DE 15 por ciento), Árabe: 53 por ciento (DE 17 por ciento), American Paint Horse: 53 por ciento (DE 14 por ciento), Cuarto de Milla: 55 por ciento (DE 13 por ciento), y Appaloosa: 56 por ciento (DE 14 por ciento) (Pickett *et al.* 1988).

Con respecto al tipo de actividad, se observan los siguientes registros: en ejemplares de salto con obstáculos, en actividad: 62.5 por ciento (rango de 5 a 80 por ciento), ejemplares de doma clásica: 65 por ciento (rango de 5 a 80 por ciento), ejemplares de concurso completo: 70 por ciento (rango de 0 a 85 por ciento), y ejemplares de salto con obstáculos, fuera de competencia: 85 por ciento (rango de 65 a 95 por ciento) (Wilson *et al.* 2019).

Se señala que un buen candidato a potro debe tener una motilidad progresiva de al menos 60 por ciento; incluso, si la motilidad está por debajo de 50 por ciento se sospecharía de problemas de sub-fertilidad (Aurich *et al.* 1997; Goldman 2001). Asimismo, Araujo *et al.* (1996) encontraron que la motilidad también es influenciada por la estacionalidad.

La motilidad debe ser evaluada con otros parámetros cuando se estima el potencial fertilizante de los espermatozoides. Usualmente la motilidad total (algún tipo de motilidad) y la motilidad progresiva (espermatozoides moviéndose activamente hacia adelante) son estimadas en porcentajes (Montalvo 2019). La motilidad puede expresarse también como oscilante, circulante y serpenteante. También se evalúa la velocidad de movimiento espermático. Si el semen es expuesto a bajas temperaturas, o se seca en un portaobjetos, la motilidad disminuye rápidamente (Katila 2001).

Se ha asociado la motilidad espermática con la fertilidad en varias especies; sin embargo, hay estudios que muestran que no hay correlación entre éstas (Dowsett y Pattie 1982; Jasko 1992; Jasko *et al.* 1992). La inconsistencia de estos resultados podría deberse en parte a la estimación visual de la motilidad. Del mismo modo, se considera que la motilidad espermática reflejaría la viabilidad de la muestra (Varner *et al.* 1991b). La energía para la motilidad es provista por las mitocondrias del espermatozoide, localizadas en la pieza intermedia. Para evaluar la función mitocondrial se usan tanto la rodamina como la carbocianina (esta última permite diferenciar espermatozoides con mitocondrias de alto o bajo potencial de membrana), aunadas al empleo de la citometría de flujo (Gravance 2000).

La evaluación del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es subjetiva, pero es una parte importante de la evaluación seminal (World Health Organization 2010). Los espermatozoides con motilidad progresiva son los únicos a los que se les considera capaces de fertilizar un óvulo. Es el mejor parámetro para predecir la fertilidad de un potro (Voss *et al.* 1981). Se requiere un número mínimo de espermatozoides móviles (100 millones) en cada inseminación para asegurar máxima eficacia reproductiva en una yegua (Hafez 1989).

La aglutinación de los espermatozoides en el semen no diluido dificulta la evaluación de la motilidad. El extendido del semen previene la aglutinación y permite la observación de los espermatozoides individualmente. La motilidad progresiva se observa mejor con el semen diluido 1 en 20, en platina caliente. Tanto los dilutores de leche descremada en polvo con glucosa (NFDMS-glucosa) como los dilutores a base de leche desnatada son satisfactorios. Un espermatozoide equino normal debería avanzar en una línea recta y realizar una revolución completa de la cabeza con cada movimiento de la cola. Los espermatozoides que no se mueven hacia adelante y rotan o aquellos que se mueven en pequeños círculos no se deben considerar como en motilidad progresiva (Buzón 2013).

d. Vitalidad

Se reporta un promedio de 49 ± 16 por ciento, en la etapa reproductiva, y de 52 ± 11 por ciento, en la etapa no reproductiva (Rodríguez y Bustos-Obregón 1996), y de 57.6 por ciento, en otra investigación, de Díaz y Arancibia (1971), citados por Sánchez (1992).

e. Anormalidades

En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales, se registran los siguientes promedios: 22 ± 16 por ciento, en la etapa no reproductiva, y 32 ± 18 por ciento, en la etapa reproductiva (Rodríguez y Bustos-Obregón 1996).

En cuanto a las diferencias entre razas, se han hallado los siguientes promedios: American Paint Horse: 45 por ciento, Árabe: 46 por ciento, Cuarto de Milla: 47 por ciento, Appaloosa: 48 por ciento, y Pura Sangre Inglés: 52 por ciento (Pickett *et al.* 1988).

Se evalúa la morfología con microscopía de luz, empleando diversas coloraciones. El empleo de pruebas con fluorescencia demanda el uso de lentes epifluorescentes en el microscopio. El escaneo y las técnicas de microscopía electrónica de transmisión no se aplican de forma rutinaria, aunque sí en estudios de investigación; en estos casos hay que ser cuidadoso en la interpretación de imágenes de transmisión (Hafez 1989). Asimismo, la morfometría se puede evaluar usando la microscopía de contraste de fase o de contraste diferencial interferencial (DIC), o con sistemas computarizados (Neild 2013). El análisis morfométrico automatizado nos da medidas objetivas precisas de la cabeza del espermatozoide y su forma (Davis *et al.* 1993). La morfología de los espermatozoides se evalúa por recuento de 200 células espermáticas teñidas con eosina-nigrosina, o nitrato de plata (Banaszewska *et al.* 2015). Los espermatozoides anormales pueden tener anomalías primarias o secundarias. Las primarias tienen su origen durante la espermatogénesis, y ocurren en los testículos (las de cabeza y pieza intermedia generalmente se consideran como primarias). Las secundarias suceden mientras se realiza el transporte a través del sistema ductal, y usualmente comprenden defectos de cola, cabezas separadas y gotas citoplasmáticas distales. Los defectos secundarios también suceden post-eyaculación por shock térmico, efecto de la luz solar y contaminación del equipo. En el potro, la unión abaxial de la pieza media a la cabeza no es considerada un defecto (Hafez 1989).

En un estudio en el que se compararon las características morfológicas de los espermatozoides de potros tailandeses cruzados, con las de potros de raza pura (Standarbred, Warm-Blood, Pura Sangre Inglés), se encontró que las cabezas fueron más grandes y redondas en los animales cruzados, y si bien no difirieron en el porcentaje de anormalidades, si lo hicieron en el tipo de anomalía. La más común en ambos grupos fue la pieza media anormal. El número de espermatozoides morfológicamente normales, con motilidad progresiva, varió entre 1.83 ± 0.37 y 4.68 ± 0.47 billones, en los animales cruzados, y de 3.18 ± 0.53 a 5.41 ± 1.61 , en los animales puros. Se considera incluso, que el perímetro de la cabeza (μm) podría servir para identificar individuos (Phetudomsinsuk *et al.* 2008).

El incremento en la cantidad anormalidades espermáticas puede estar relacionado a una disminución de la fertilidad (Voss *et al.* 1981; Dowsett y Pattie 1982). Más del 10 por ciento de anomalías primarias, o del 30 por ciento de las secundarias, pueden reducir la fertilidad del eyaculado (Bielanski 1975). Si hubiese una cantidad alta de espermatozoides anormales y, en contrapartida, también hubiese una cantidad adecuada de espermatozoides normales, el eyaculado aún podría considerarse fértil.

f. Integridad de membrana citoplasmática

En cuanto al porcentaje de integridad de membrana citoplasmática, hay un estudio en donde el promedio de esta característica, en potros Peruano de Paso, es de 30.3 por ciento, con un rango de 19 a 40 por ciento (Ruiz 2002).

La membrana citoplasmática es fundamental para la supervivencia del espermatozoide. El test hipo-osmótico, conocido como test de HOS (Hypo-Osmotic Swelling) se ideó inicialmente para evaluar la actividad bioquímica de la membrana citoplasmática físicamente intacta. Se basa en que el espermatozoide, con su membrana citoplasmática funcional, al ser expuesto a una solución hipo-osmótica, hace fluir el agua a través de su membrana, reestableciendo el equilibrio entre los compartimentos extra e intracelular. El espermatozoide aumenta de volumen, y la membrana que cubre la cola del espermatozoide se hincha. Esto es señal de que la membrana está intacta (Katila 2001). Tiempo después se desarrolló el método para varias especies de mamíferos, entre ellas el equino, más para evaluar la calidad del semen que para examinar su capacidad fertilizante; se ha experimentado con diversos solutos y concentraciones de los mismos, tanto para muestras frescas, refrigeradas y descongeladas.

Se ha señalado que el porcentaje de espermatozoides vivos es mayor que el porcentaje de espermatozoides positivos al test de HOS, y este a su vez es mayor que el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Mansour 2009).

De Albuquerque Lagares, citado por Katila (2001), reportó la presencia de vesículas en la cola, con mayor frecuencia cuando la osmolaridad de la solución estuvo entre 100 y 150 mOsm, y Neild *et al.* (1999), también citado por Katila (2001), encontró lo mismo entre 25 y 100 mOsm. Se considera que el test de HOS, aplicado en la evaluación del semen fresco, es el mejor predictor de la resistencia al congelamiento del semen de equino (Katila 2001).

En la Tabla 9 se aprecia la variación en el porcentaje de integridad de la membrana citoplasmática por efecto de diferentes solutos y osmolaridades:

Tabla 9: Porcentaje de integridad de la membrana citoplasmática para espermatozoides de potros incubados en soluciones de variado soluto y osmolaridad

Osmolaridades (mOsm)	Sacarosa	Fructosa	Citrato de sodio	Sacarosa / citrato de sodio	Fructosa / citrato de sodio
0	55.3 ± 2.4	59.3 ± 2.0	57.3 ± 3.5	57.0 ± 3.2	59.3 ± 0.3
50	74.3 ± 4.9	63.7 ± 5.2	73.0 ± 5.0	61.7 ± 4.1	65.3 ± 5.0
100	81.7 ± 5.8	69.0 ± 13.1	74.3 ± 4.7	74.0 ± 6.4	69.7 ± 5.9
150	75.0 ± 10.7	46.0 ± 5.6	63.7 ± 5.5	50.0 ± 7.5	69.7 ± 10.9
200	14.7 ± 1.7	31.0 ± 8.5	18.7 ± 6.3	32.3 ± 8.7	30.0 ± 4.6
250	9.3 ± 0.3	22.7 ± 4.1	7.7 ± 0.9	18.7 ± 6.2	9.0 ± 0.6
300	8.3 ± 2.3	24.0 ± 6.1	9.3 ± 1.2	10.0 ± 0.0	5.3 ± 2.0

FUENTE: Nie y Wenzel (2001)

Se puede apreciar, de forma general, el incremento del porcentaje de integridad de la membrana citoplasmática conforme se incrementa la osmolaridad de la solución, hasta el nivel de 100 mOsm (en el caso de la combinación de fructosa y citrato de sodio el incremento se mantuvo hasta los 150 mOsm), luego de lo cual el porcentaje decrece.

En cuanto al tipo de soluto, conforme se incrementa la cantidad de soluto, hasta los 150 mOsm, es la sacarosa con la que consigue los mayores porcentajes de integridad de membrana citoplasmática, seguida de los solutos que contienen citrato de sodio. Cuando la cantidad de soluto es de 200 mOsm o más, es la fructosa y la combinación de sacarosa y citrato de sodio las que dan mayores porcentajes de integridad de membrana citoplasmática.

En otros aspectos del mismo estudio, no se observó variación de los resultados asociada a la temperatura, número total de espermatozoides examinados, y al tiempo de incubación. Para este último factor, se ensayaron diversos tiempos de incubación (desde 15 hasta 180 minutos), encontrando que no hay mayor variación (entre 70.7 y 77.3 por ciento).

En la Tabla 10 se aprecian diversos coeficientes de correlación entre el porcentaje de integridad de la membrana citoplasmática (hipo-osmosis), el porcentaje de motilidad progresiva, y otras características seminales:

Tabla 10: Coeficientes de correlación entre la hipo-osmosis, la motilidad progresiva, y otras características seminales en el potro

Características	Hipo-osmosis	Motilidad progresiva
Motilidad progresiva	+0.68	-
Vitalidad espermática	+0.53	+0.89
Concentración espermática	+0.53	+0.69

FUENTE: Sánchez (1992)

Se aprecia que las correlaciones que involucran a la motilidad progresiva son mayores que las que involucran a la hipo-osmosis. Del mismo modo, aquellas que involucran a la vitalidad espermática tienen mayores valores que las que involucran a la concentración espermática.

Los datos muestran que el espermatozoide del potro es capaz de adaptaciones reversibles significativas de su volumen celular medio. Neild *et al.* (1999), citados por Katila (2001), reporta que el espermatozoide de equino es capaz de incrementar su volumen hasta 6.1 veces en condiciones iso-osmóticas. Sin embargo, tanto la motilidad como la vitalidad decrecen si el medio cambia hacia condiciones hipo-osmóticas, y no se recuperan si se vuelven a las condiciones iso-osmóticas. Asimismo, la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana citoplasmática parecen permanecer intactas ante condiciones hiper-osmóticas; sin embargo, sufre un marcado decrecimiento la actividad mitocondrial cuando se presentan condiciones hipo-osmóticas. Esto sugiere que el proceso de congelamiento no dañaría tanto al semen como el descongelamiento del mismo (Pommer *et al.* 2002).

2.4.2. Tinciones convencionales

El método de evaluación más usado consiste en fijar los espermatozoides en una solución buffer formol-salina o de glutaraldehído, y ver las células que no se tiñen, con un microscopio de contraste de fase o con microscopía diferencial de interferencia-contraste. Se pueden emplear varias coloraciones comunes (Wright, Giemsa, hematoxilina-eosina, tinta china), y otras no tan frecuentes (eosina-anilina, eosina-nigrosina, eosina-fast green) para evaluar la vitalidad seminal. Ya que hay una alta correlación entre el porcentaje de motilidad progresiva y de vitalidad, se considera que la tinción supravital no proporciona información adicional de relevancia en los casos en que la motilidad es buena (Love *et al.* 2003; Brinsko *et al.* 2003). Los resultados de la tinción supravital y el test de HOS no guardan mucha relación, pues la primera se usa para evaluar daños físicos en la membrana, y el segundo para evaluar la actividad bioquímica de la membrana (Zhu y Liu 2000). En el caso de las tinciones supravitales la membrana citoplasmática funcional tiene la habilidad de excluir el colorante, el cual difunde pasivamente dentro de aquellas células con la membrana dañada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCEDENCIA

Los cuatro criaderos de los potros Peruano de Paso de los que provinieron las 14 muestras de semen se sitúan en la parte sur de la ciudad de Lima, extendiéndose desde Chorrillos hasta Mala, como se aprecia en la Tabla 11:

Tabla 11: Localización de los criaderos de los potros Peruano de Paso empleados en el estudio

Localidad	Número de animales
Pachacamac	4
Chorrillos	3
Huachipa	2
Mala	5

La colección de las muestras se realizó entre los meses de enero y marzo del año 2003. Se usaron potros con más de tres años de edad (edad adulta), con un descanso sexual de no menos de una semana, y experiencia previa siendo colectados con vagina artificial. Se trabajó con un único eyaculado por ejemplar, sin muestra de ensayo, debido al alto valor económico de los ejemplares, y el valor de su servicio.

El examen microscópico de las características del semen fresco se realizó en un consultorio de Andrología y Reproducción Humana, situado en el distrito de Miraflores.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Medición de los testículos

Las mediciones testiculares se realizaron desde el lado izquierdo del potro, con un vernier escrotal (calipers) (Figura 1). Ambos testículos fueron jalados ligeramente hacia abajo con la mano izquierda. Los calipers fueron puestos a ambos lados del escroto de modo que abarque la distancia que hay entre las curvaturas mayores de ambos testículos. La curvatura mayor del testículo derecho fue localizada con el meñique, en tanto que la curvatura mayor del izquierdo fue determinada visualmente. La distancia entre ambos puntos es el ancho escrotal total.



Figura 1: Calipers

3.2.2. Colección de semen

El semen se obtuvo usando una vagina artificial (modelo CSU) (Figura 2) con dispositivo para separar la fracción de gel (filtro). La vagina artificial fue llenada previamente con 10 litros de agua a 51 °C (lo que dio una temperatura interna de la vagina de 42-45 °C). Se cubrió la superficie interna de la vagina con un forro (de plástico, descartable), el cual fue lubricado una vez instalado, y se usó una capucha térmica en el extremo del aparato, donde va la botella de colección, a fin de mantener la muestra protegida del frío y la luz.

Inmediatamente luego de haber sido hecha la colección, se puso el frasco con la muestra en un termo que contenía agua a 37 °C (para evitar el shock por frío) a fin de transportar la muestra al laboratorio (alrededor de una hora y 30 minutos). En cada oportunidad en que se hizo la colección de semen, se colectó a un único ejemplar, a fin de minimizar el tiempo de transporte de la muestra al laboratorio.



Figura 2: Vagina artificial modelo CSU

3.3. EVALUACIÓN SEMINAL

La calidad del semen se determinó por evaluación del volumen del eyaculado (usando una probeta), la concentración de espermatozoides por cc (usando la cámara de Neubauer), y los porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva, vivos (usando eosina para teñir a los muertos), morfológicamente normales, y con membrana citoplasmática íntegra. Todos los exámenes se hicieron usando un microscopio de luz a 400X, con platina caliente (37°C).

Para la evaluación de la integridad de la membrana citoplasmática (test de HOS) se incubaron 10 μl de la muestra con 100 μl de una solución buffer hipo-osmótica (fructosa, 150 mOsm/L) a 37 °C, por 30 minutos, luego de los cuales se hizo la evaluación (Figura 3):



Figura 3: Test de HOS positivo
(se aprecia el hinchamiento en el extremo del flagelo)

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el cálculo de la estadística descriptiva para cada variable:

Promedio (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Desviación estándar (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Coefficiente de variación (C.V.):

$$C. V. = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Asimismo, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r_{xy}) entre el diámetro escrotal y cada una de las características seminales. Previamente se sometió cada variable a una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov para una muestra):

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

x: diámetro escrotal

y: característica seminal

Se determinó el nivel de significancia de los coeficientes de correlación mediante una prueba de t.

Asimismo, para evaluar el efecto del criadero de procedencia de las muestras sobre las variables se hizo el análisis de varianza de una vía, para cada caso.

Para todos los cálculos se empleó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 24.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS GENERALES

En la Tabla 12 se aprecia las medidas de resumen correspondientes a las características consideradas en el presente trabajo (los registros completos se pueden observar en el Anexo 1):

Tabla 12: Medidas de resumen del diámetro escrotal y las características seminales de los 14 potros del estudio

Característica	Media	DE	CV	Mín	Máx
Diámetro escrotal (mm)	83.86	11.29	7.43	66	101
Volumen (cc)	64.29	26.07	2.47	31	104
Concentración (10 ⁶ /cc)	91.79	64.28	1.43	22	207
Motilidad (porcentaje)	52.21	18.1	2.88	27	80
Vitalidad (porcentaje)	77.93	12.39	6.29	51	93
Anormalidades (porcentaje)	27.07	6.52	4.15	15	39
Integridad de membrana citoplasmática (porcentaje)	61.29	13.4	4.57	45	82

DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, Mín: mínimo, Máx: máximo

Si bien se registraron variaciones en cada una de las características seminales consideradas en el presente estudio, se ha tratado de disminuir este efecto haciendo la colección en animales que superaban los tres años de edad (etapa de madurez sexual) (McKinnon y Voss 1993), que hubieran sido sometidos previamente a la colección de semen con vagina artificial, y que hubieran tenido un descanso sexual no menor a una semana, como criterios de inclusión en el estudio.

Las diferencias existentes podrían deberse también, entre otros factores, al grado de estímulo (no todas las yeguas usadas tenían la misma receptividad) (Hafez 1989). Comparando la variación de las diferentes características medidas, vemos que la concentración espermática fue la que tuvo menor variación, y el diámetro escrotal fue la que tuvo más.

De otro lado, en la Tabla 13 se presenta las medidas de resumen del diámetro escrotal y las características seminales correspondientes a cada uno de los cuatro criaderos, ya que los aspectos de manejo, alimentación y otros factores propios de cada establecimiento pudieron influir también en los resultados obtenidos:

Tabla 13: Medidas de resumen del diámetro escrotal y las características seminales de los potros del estudio correspondientes a cada uno de los cuatro criaderos

Características		Criaderos			
		C1	C2	C3	C4
Diámetro escrotal	Media	80.50	86.67	85.75	82.00
	DE	10.61	8.08	10.01	16.09
	CV	13.18	9.33	11.68	19.63
Volumen	Media	50.00	42.00	71.00	78.00
	DE	12.73	10.54	24.75	29.97
	CV	25.46	25.08	34.86	38.43
Concentración	Media	58.50	117.00	103.25	80.80
	DE	31.82	66.30	77.37	71.93
	CV	54.39	56.67	74.93	89.02
Motilidad	Media	57.50	38.33	59.50	52.60
	DE	3.54	11.50	19.05	22.62
	CV	6.15	30.01	32.02	43.01
Vitalidad	Media	80.50	70.67	87.75	73.40
	DE	2.12	12.50	5.32	15.27
	CV	2.64	17.69	6.06	20.81
Anormalidades	Media	26.50	21.33	25.50	32.00
	DE	2.12	5.51	7.59	4.58
	CV	8.00	25.82	29.78	14.32
Integridad de membrana citoplasmática	Media	54.00	73.67	58.50	59.00
	DE	9.90	7.23	14.18	15.03
	CV	18.33	9.82	24.23	25.48

DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación, C1, C2, C3, y C4: criaderos 1, 2, 3 y 4

4.2. CARACTERÍSTICAS

4.2.1. Diámetro escrotal

En cuanto al diámetro escrotal, se obtuvo un promedio de 83.9 mm, con un rango entre 66 y 101 mm. Estos valores están por debajo de otros promedios reportados (Thompson *et al.* 1979; McKinnon y Voss 1993; Muñoz-Alonso *et al.* 2016; Pickett *et al.* 1988, Sisson 1993). Estas diferencias podrían atribuirse a factores tales como el tamaño corporal (Kavak 2003), la edad (Stout y Colenbrander 2011a; Weber 2012; Coelho *et al.* 2015), o la estación del año (Clay *et al.* 1987).

Asimismo, el promedio hallado está bastante por debajo de los promedios encontrados en otras razas por Pickett *et al.* (1988), aunque en este mismo reporte se aprecia variación por efecto de la raza.

4.2.2. Características seminales

a. Volumen

En cuanto al volumen del eyaculado, se obtuvo un promedio de 64 cc, con un rango de 31 a 104 cc. El promedio obtenido en el estudio estuvo por debajo de los hallados en otros estudios (Bielanski 1951; MacLeod y McGee 1950; Rodríguez y Bustos-Obregón 1996; Nishikawa 1959), y por encima de los encontrados por el propio Nishikawa (1959), y Pickett *et al.* (1988). Estas diferencias podrían deberse, entre otros factores, al efecto de la edad (Pickett *et al.* 1988; Hafez 1989; Vásquez 2019).

En comparación con otras razas, el volumen promedio encontrado fue mayor que los reportados por Pickett *et al.* (1988). Esto tiene relación con lo señalado por Hafez (1989), quien indica que la raza es un factor que influye en el volumen del eyaculado.

Por otra parte, los resultados obtenidos contrastan marcadamente con un estudio realizado en potros de raza Chilote (criollo chileno), en el que el volumen fue en promedio de 2.1 cc, con un rango entre 1.2 y 7 cc (Cox 2005). Esto podrían deberse a que los ejemplares de la raza Chilote tienen una alzada menor (entre 113 y 121 cm) (Barrera 1998) que la de los ejemplares Peruano de Paso (146 cm) (Barrantes *et al.* 2009). Dowsett y Knott (1996) indican que el volumen del eyaculado tiene una relación directa con el tamaño de los potros (raza).

Asimismo, en relación a otros estudios hechos en potros Peruano de Paso, el promedio hallado estuvo por encima de los registrados por Aznarán (2019) y Vásquez (2019), aunque ellos realizaron su trabajo en otra época del año. Hay varias investigaciones que establecen que el volumen seminal varía con la estación del año (Nishikawa 1959; McKinnon y Voss 1993; Magistrini 1999; Janett *et al.* 2003a); esto podría deberse al efecto de la fotoperiodicidad (Johnson 1991).

En cuanto al tipo de actividad, el promedio encontrado coincide con los resultados encontrados por Wilson *et al.* (2019), en ejemplares de salto con obstáculos, en actividad; sin embargo, está por encima de los hallados en ejemplares dedicados a otras actividades, aunque en este mismo estudio se muestra bastante variabilidad por este factor.

b. Concentración

En cuanto a la concentración espermática, se obtuvo un promedio de 91.8 millones/cc, con un rango entre 22 y 207 millones/cc. Este promedio está por debajo de los hallados en otros estudios (MacLeod y McGee 1950; Nishikawa 1959; Rodríguez y Bustos-Obregón 1996; Pickett *et al.* 1988; Bielanski 1951). Estas diferencias pueden deberse a factores tales como la edad (Pickett *et al.* 1988), o la estación del año (Pickett *et al.* 1976; Jasko *et al.* 1991; Janett *et al.* 2003b).

Del mismo modo, el promedio encontrado está marcadamente por debajo de los registrados por Pickett *et al.* (1988) para otras razas, aunque también entre estas hay bastante variación. Asimismo, en comparación con otro estudio hecho en potros Peruano de Paso, el promedio hallado estuvo muy por debajo del registrado por Aznarán (2019).

En cuanto al tipo de actividad, el promedio hallado está bastante por debajo de los encontrados por Wilson *et al.* (2019), aunque en este mismo los autores muestran que hay mucha variabilidad en los promedios dependiendo del tipo de actividad.

c. Motilidad

En cuanto a la motilidad, se obtuvo un promedio de 52 por ciento, con un rango entre 27 y 80 por ciento, Este promedio está por debajo de los encontrados en otros reportes: (Pickett *et al.* 1988; McKinnon y Voss 1993; Bielanski 1975; Nishikawa 1959). De igual manera, está por encima de los promedios hallados por Rodríguez y Bustos-Obregón (1996), tanto en la etapa no reproductiva como en la reproductiva. Estas variaciones podrían deberse a efecto de la edad, como lo reportan también Pickett *et al.* (1988), o a la estación de año (Schmidt *et al.* 1987; Araujo *et al.* 1996; Gamboa *et al.* 2010).

Asimismo, comparando los resultados con el reporte de Pickett *et al.* (1988), el promedio hallado coincide con el valor encontrado en potros Pura Sangre Inglés, pero está por debajo de los valores encontrados en otras razas, aunque la variación no es mucha.

Por otra parte, el promedio encontrado está por debajo de los encontrados por Wilson *et al.* (2019), en potros dedicados a diversas actividades, aunque en este mismo estudio se aprecia un amplio rango de promedios entre las diversas actividades.

d. Vitalidad

Se registró un promedio de 77.9 por ciento, con un rango de 51 a 93 por ciento. Este promedio está por encima del encontrado por de Díaz y Arancibia (1971), citados por Sánchez (1992), y de los registrados por Rodríguez y Bustos-Obregón (1996), en distintas estaciones del año (antes y durante la etapa reproductiva, en la estación del año con más horas de luz/día).

Esto indica que el método de conservación de las muestras para el transporte de las mismas fue adecuado, a pesar del periodo de tiempo que este implicaba (en promedio una hora y media), ya que un cambio marcado de temperatura de las mismas se hubiese reflejado en el porcentaje de vitalidad (Yates y Whitacre 1993).

e. Anormalidades

En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales, se obtuvo un promedio de 27 por ciento, con un rango de 15 a 39 por ciento. Este promedio se encuentra por debajo del registrado por Rodríguez y Bustos-Obregón (1996) en la época de reproducción, pero es mayor al que se registra, en este mismo estudio, para la etapa no reproductiva. En este caso puede haber influido también la edad de los potros (Pickett *et al.* 1988).

Asimismo, aunque Pickett *et al.* (1988) muestran que el porcentaje de anormalidades no varía de forma importante en diferentes razas, el promedio hallado en el presente estudio está bastante por debajo de los encontrados por ellos, por lo cual la variación debe atribuirse a otros factores.

f. Integridad de membrana citoplasmática

En cuanto al porcentaje de integridad de membrana citoplasmática, el promedio fue de 61.3 por ciento, y el rango estuvo entre 45 y 82 por ciento, Este promedio está por encima, de forma marcada, que el valor encontrado en otro trabajo realizado en Lima, en potros Peruano de Paso, por Ruiz (2002), quien trabajó con una solución de sacarosa, a una concentración de 100 mOsm.

Esto contrasta también con las investigaciones de Nie y Wenzel (2001), en las que se obtienen mayores porcentajes de integridad de membrana citoplasmática usando sacarosa en vez de fructosa (la cual se empleó en el presente estudio), tanto a 100 mOsm como a 150 mOsm (concentración usada en el presente estudio). Los mismos investigadores también reportan mejores porcentajes de integridad de membrana citoplasmática usando fructosa en vez de sacarosa cuando la concentración va de 200 mOsm a más, aunque de todos modos, para el caso de ambos solutos, los mejores resultados se observan con concentraciones entre 100 y 150 mOsm.

Asimismo, el promedio encontrado en el presente trabajo fue bastante mayor que el reportado por Nie y Wenzel (2001), usando el mismo soluto, concentración, temperatura y tiempo de incubación, por lo cual esta diferencia debe ser atribuible a otros factores no analizados en este estudio. Sin embargo, también es de señalarse que ellos obtuvieron mayores porcentajes de integridad membrana citoplasmática, manteniendo los mismos factores pero usando la fructosa, en combinación con citrato de sodio, como soluto, o el citrato de sodio solo, o sacarosa (en este último caso obtuvieron el mayor porcentaje).

4.2.3 Coeficientes de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales

En la Tabla 13 se aprecia los coeficientes de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales, así como el p-valor para cada caso:

Tabla 14: Coeficientes de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales

Característica seminal	Volumen	Concentración	Motilidad	Vitalidad	Anormalidades	Integridad citoplasmática
Diámetro escrotal	-0.060	+0.684	-0.075	-0.240	-0.405	-0.056
p-valor	0.838	0.007	0.798	0.408	0.151	0.850

En la Figura 4 se aprecia el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y el volumen seminal. Se ve, en la gran dispersión de puntos, que no hay realmente una tendencia significativa:

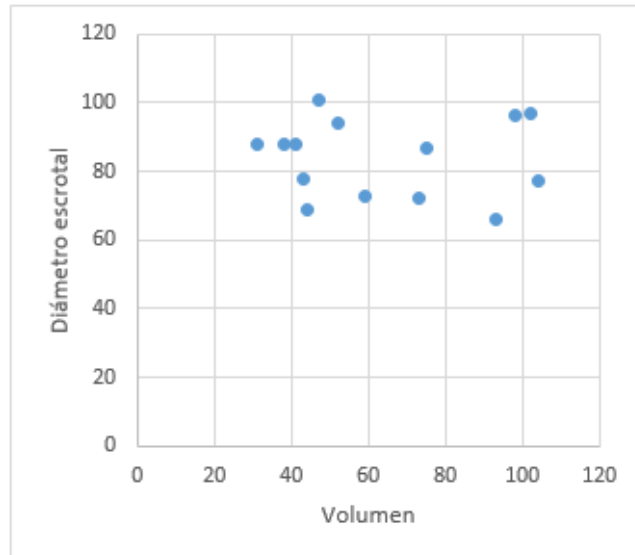


Figura 4: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y el volumen seminal

En la Figura 5 se ve el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y la concentración seminal. Hay poca dispersión de puntos, evidenciando una tendencia significativa:

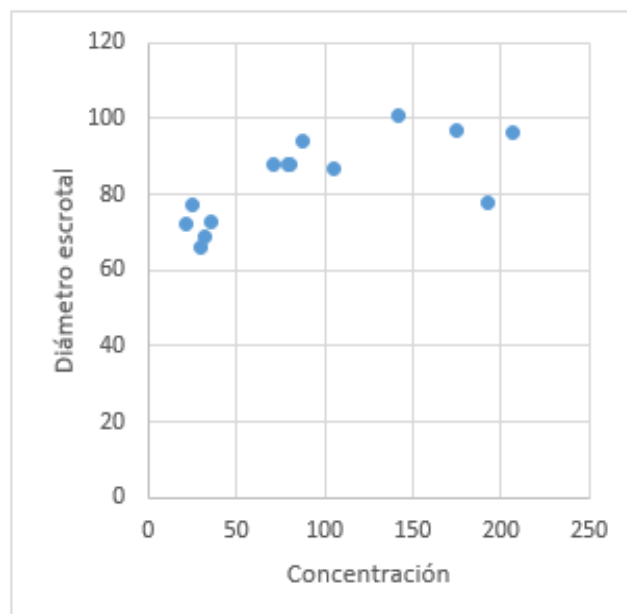


Figura 5: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la concentración seminal

En la Figura 6 se ve el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y el porcentaje de motilidad espermática. Hay una mayor dispersión de puntos, por lo cual no hay una tendencia significativa:

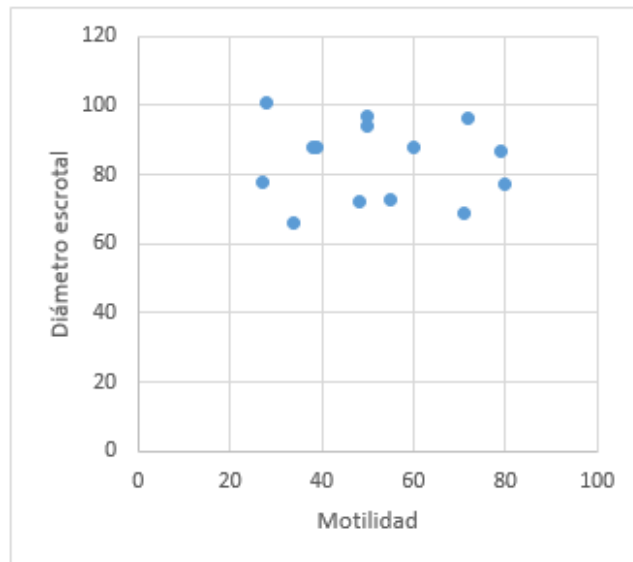


Figura 6: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la motilidad espermática

En la Figura 7 se observa el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y el porcentaje de vitalidad espermática. Se aprecia aún bastante dispersión de puntos, por lo cual no hay una tendencia significativa:

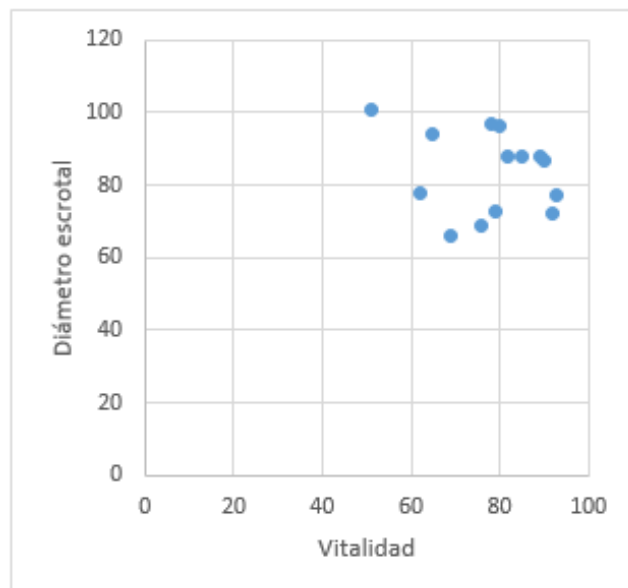


Figura 7: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la vitalidad espermática

En la Figura 8 se aprecia el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y el porcentaje de anomalías espermáticas. Se observa menor dispersión de puntos, pero no hay una tendencia significativa:

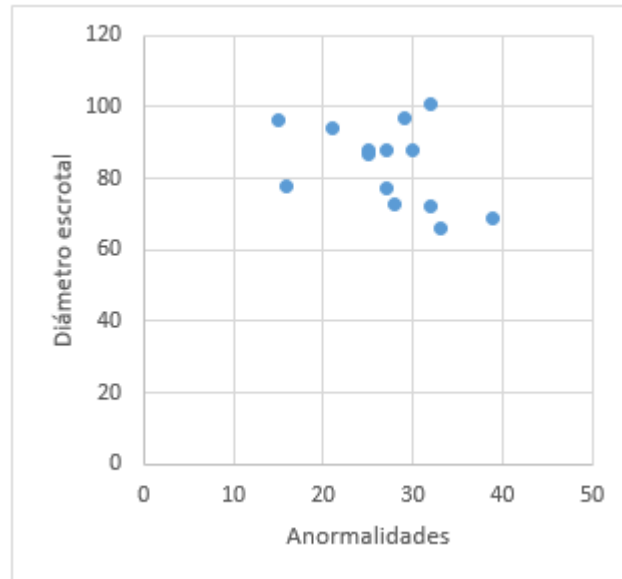


Figura 8: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y las anomalías espermáticas

En la Figura 9 se ve el gráfico de dispersión correspondiente al diámetro escrotal y el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática. Hay gran dispersión de puntos, (no hay una tendencia significativa):

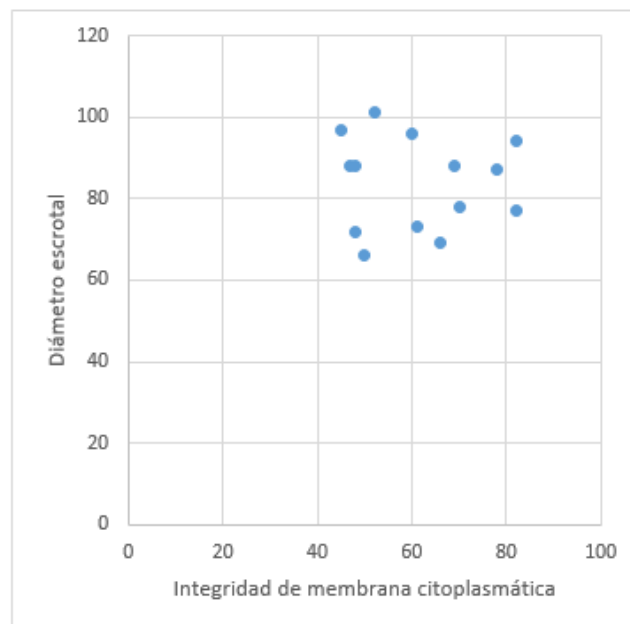


Figura 9: Gráfico de dispersión entre el diámetro escrotal y la integridad de membrana citoplasmática

El tamaño testicular es considerado un buen indicador del gasto espermático diario, y por lo tanto, de la calidad reproductiva de un potro (Blanchard 1996). Este puede ser estimado a través del diámetro escrotal. Se sabe que hay una alta correlación entre el ancho escrotal total y la producción espermática diaria (+0.75), o con el gasto espermático diario (+0.55) (Thompson *et al.* 1979). Asimismo, otra evidencia de la asociación entre el tamaño testicular y la calidad reproductiva del potro son las correlaciones que hay entre la circunferencia escrotal y el gasto espermático diario (entre +0.67 y +0.72) (Kavak 2004), y entre el largo escrotal y la producción espermática diaria (+0.83) (Thompson *et al.* 1979).

Las correlaciones que involucran al ancho testicular (el diámetro testicular es una forma de medirlo) son aún mayores que las que incluyen al largo testicular. Esto se ilustra en el trabajo de McKinnon y Voss (1993): entre +0.68 y +0.76 para ancho testicular y producción espermática diaria, y entre +0.52 y +0.59 para largo testicular y producción espermática diaria. Del mismo modo, entre +0.50 y +0.61 entre el ancho testicular y el gasto espermático diario, y entre +0.34 y +0.50 para el largo testicular y el gasto espermático diario. Por otra parte, las correlaciones que involucran a la producción espermática diaria con alguna medida testicular son mayores que las que consideran al gasto espermático diario. Sin embargo, hay que considerar que hay una alta correlación entre la producción y el gasto espermático diario (+0.80 (Gebauer *et al.* 1979); +0.83 (Navak *et al.* 1990)).

El análisis estadístico del presente estudio revela que hay correlación, con p-valor significativo (0.007), entre el diámetro escrotal y la concentración espermática (+0.684), a pesar del reducido tamaño de la muestra (n=14). Esto nos indicaría que trabajando con un tamaño de muestra mayor podríamos tener correlaciones de mayor significancia estadística aún, como podría ser el caso de la que se encontró entre el diámetro escrotal y el porcentaje de anormalidades (-0.405, con p-valor de 0.151).

Con respecto al porcentaje de espermatozoides normales, los estudios indican diversos grados de asociación con el porcentaje de motilidad: entre +0.50 y +0.70 (Pickett *et al.* 1988), y con el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática: +0.75 (Neild *et al.* 1999). Sin embargo, estas asociaciones entre estas variables no tienen correspondencia con las correlaciones halladas en este estudio entre el diámetro escrotal con la motilidad y el porcentaje de integridad citoplasmática: -0.075 y -0.056, respectivamente, ni en magnitud ni en sentido. Solamente se corresponden, indirectamente, en la dirección de la asociación con el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática, a través de la correlación entre ésta y el porcentaje de espermatozoides normales, reportada por Alierta *et al.* (1999): -0.186, y las correlaciones registradas en el presente estudio entre el diámetro escrotal con los porcentajes de anormalidades espermáticas y de integridad de membrana (a mayor diámetro escrotal, mayor porcentaje de espermatozoides normales, pero menor porcentaje de integridad citoplasmática).

De forma similar, al tener asociación con la concentración espermática, podíamos esperar que el diámetro escrotal tuviese una asociación importante con otras características seminales, tales como la motilidad y el porcentaje de integridad citoplasmática, teniendo en cuenta las correlaciones entre la concentración espermática y las características antes mencionadas: +0.69 y +0.53, respectivamente (Sánchez 1992). Sin embargo, una vez más, las correlaciones encontradas en el presente trabajo entre el diámetro escrotal y la motilidad y el porcentaje de integridad citoplasmática muestran una muy baja fuerza de asociación, e incluso, de sentido contrario (correlación negativa), lo cual indicaría que a mayor diámetro escrotal habría una disminución en estas características, afectando la calidad del eyaculado.

Igualmente, se esperaría una correlación positiva entre el diámetro escrotal y el volumen seminal. En forma indirecta, las correlaciones entre el volumen testicular y el volumen del eyaculado registradas por Vásquez (2019), en potros Peruano de Paso, indicarían que ambas variables tuviesen una correlación positiva (+0.189, en invierno, y +0.374, en primavera, respectivamente). No obstante, nuevamente el resultado hallado en el presente estudio (-0.060) difiere en magnitud y sentido. Se señala que la estación del año afecta la producción y el gasto espermáticos, por lo cual este factor también podría haber influido en las diferencias expuestas (el trabajo se realizó en verano). De hecho, Blanchard (1996) indica que hay mayor producción espermática diaria en la primavera, y Horruitiner (2000) indica que hay mayor fertilidad en el segundo semestre del año.

En cuanto a la correlación entre el diámetro escrotal y el porcentaje de vitalidad (-0.240), el sentido de la misma se corresponde con la asociación registrada entre el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de vitalidad: -0.297 (Alierta *et al.* 1999), pues a mayor diámetro escrotal hay menor porcentaje de vitalidad, pero mayor porcentaje de espermatozoides normales. Más bien, este tipo de correspondencia en el sentido de las asociaciones no se da cuando hacemos la comparación con la correlación entre el porcentaje de integridad de membrana citoplasmática y el porcentaje de espermatozoides vivos, reportada también por Alierta *et al.* (1999): -0.195.

Debido a todo lo expuesto, el diámetro escrotal podría tomarse como un indicador indirecto de la concentración espermática del potro (es la única correlación estadísticamente significativa encontrada), pero no hay evidencia de que haya asociación estadística significativa con el resto de características seminales, por lo cual su empleo como estimador de estas no es posible, a la luz de los resultados obtenidos.

De forma particular, al ser considerado el porcentaje de motilidad como el mejor predictor de la fertilidad del potro (Voss *et al.* 1981), hubiese sido adecuado, en este sentido, que la correlación entre el diámetro escrotal y el porcentaje de motilidad hubiese sido positiva. Además, la relación entre características seminales descrita por Mansour (2009), en la cual el porcentaje de vitalidad tiende a ser mayor que el de integridad de membrana citoplasmática, y este a su vez mayor que el de motilidad, hacen más evidente aún de la importancia que reviste en el que haya una correlación alta y estadísticamente significativa entre la medida anatómica (en este caso, el diámetro escrotal) que se desea usar como predictor de las características seminales, y el porcentaje de motilidad.

Finalmente, cabe dejar en claro que el trabajo se ha realizado con muestras de semen fresco, por lo cual podría presentarse variación en los coeficientes de correlación encontrados si se trabajan con muestras que hayan pasado por algún proceso de refrigeración, como se aprecia en el trabajo realizado por Ruiz (2002), en Lima, en potros Peruano de Paso.

V. CONCLUSIONES

- Los valores promedio hallados fueron: diámetro escrotal (83.86 mm), volumen (64.29 cc), concentración (91.79 millones/cc), y los porcentajes de motilidad (52.21), vitalidad (77.93), anormalidades (27.07), y de integridad de membrana citoplasmática (61.29).
- El porcentaje de integridad de membrana citoplasmática fue bastante alto, con un promedio de 61.29 por ciento, lo que contrasta con el promedio encontrado en otro trabajo hecho en la misma raza de equinos, en Lima (30.3 por ciento).
- Los coeficientes de correlación del diámetro escrotal con el volumen, y los porcentajes de motilidad, de vitalidad, de anormalidades, y de integridad de membrana citoplasmática, fueron -0.060, -0.075, -0.240, -0.405, y -0.056, respectivamente, con p-valores no significativos. No hay evidencia de asociación con estas características.
-
- El coeficiente de correlación del diámetro escrotal con la concentración de espermatozoides, fue +0.684, y mostró un p-valores significativo. Por este motivo, el diámetro escrotal podría considerarse para predecir la concentración espermática.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el coeficiente de correlación entre el diámetro escrotal y las características seminales de los potros con una muestra de mayor tamaño, a fin de obtener valores con mayor nivel de significancia.
- Replicar el mismo trabajo en el segundo semestre del año, esperando encontrar valores de las características seminales superiores a los registrados en este estudio, por el efecto de la estacionalidad. Esto podría hacer variar los coeficientes de correlación de las características seminales con el diámetro escrotal.
- Establecer el coeficiente de correlación con otras características de la anatomía testicular, tales como el perímetro escrotal, lo cual, dependiendo de los resultados que se obtuviesen, podrían determinar el uso de estas otras mediciones como mejores predictores indirectos de algunas características seminales.
- Ajustar las características de la prueba de integridad de membrana citoplasmática, pues algunos valores bajos registrados en la literatura podrían deberse no solamente a la baja calidad de la muestra de semen, sino a los criterios utilizados para la lectura de la prueba en mención.
- Procurar que, en trabajos futuros sobre este tema, los potros provengan de un solo lugar, a fin de evitar la variabilidad que ocasiona el manejo y alimentación de los diferentes criaderos, y de esta forma, registrar algunos cambios en las correlaciones calculadas en el presente estudio.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alierta, S; Losinno, L; Aguilar, J; Maria, G; Gil, L; Moschetti, E. 1999. Correlaciones entre el test hipo-osmótico y otros parámetros utilizados en la evaluación del semen equino ciopreservado. *Información Técnica Económica Agraria (ITEA)*, 20(2): 612-613
- Araujo, J; Righini, A; Fleury, J; Caldas, M; Costa-Neto, J; Marques, N. 1996. Seasonal rhythm of semen characteristics of a Brazilian breed ("Mangalarga") stallion. *Chronobiology International*. 13:447
- Aurich, J; Schonherr, V; Hoppe, H; Aurich, C. 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology*. 48:185-192
- Aznarán, R. 2019. Relación entre el volumen testicular, volumen del eyaculado y concentración espermática en caballos inscritos en la Asociación de Criadores y Propietarios del Caballo Peruano de Paso-Lambayeque. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Lambayeque. Perú. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 53 p.
- Banaszewska, D; Andraszek, K; Szostek, M; Wójcik, E; Danielewicz, A; Walczak-Jędrzejowska, R. 2015. Analysis of stallion semiologic semen parameters. *Medycyna Weterynaryjna*, 71(9): 563-567
- Barrantes, C; Macedo, O; Rosemberg, M; Sarria, M. 2009. Estudio de las medidas hipométricas del caballo peruano de paso. *Anales científicos UNALM*, 70(1): 58-66
- Barreda, M. 1998. Parámetros morfológicos y tipificación de Polimorfismos Antigénicos Eritrocitarios y Bioquímicos como base del Stud Book de la raza Caballo Chilote. Tesis para optar al Grado de Licenciado en medicina Veterinaria. Valdivia. Chile. Universidad Austral de Chile. 85 p.

- Berndtson, W; Squires, E; Thompson, D. 1983. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis is influenced by season. *Theriogenology*, 20: 449-457
- Bielanski, W. 1951. Characteristics of the semen of stallions, macro and microscopic investigations with estimation of fertility. *Memories of Academy of Political Sciences. Let. B*, 16: 119-122
- Bielanski, W. 1975. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23(1): 19-25
- Blanchard, T. 1996. Evaluating breeding-soundness in stallions-2: Semen collection and evaluation. *Veterinary Medicine*, 91(2): 150
- Blanchard, T; Varner, D; Schumacher, J; Love, C; Brinsko, S; Rigby, S. 2003. *Manual of Equine Reproduction*. 2° ed. Estados Unidos. Ed. Mosby, 272 p.
- Brinsko, S. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1): 129-136
- Brinsko, S; Blanchard, T; Rigby, S. 2003. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. *Theriogenology*, 59: 735-742
- Brinsko, S; Blanchard, T; Varner, D; Schumacher, J; Love, C; Hinricks, K; Hartman, D. 2011. *Manual of Equine Reproduction*. 3° ed. Estados Unidos. Ed. Mosby, 325 p.
- Burns, P; Jawad, M; Weld, J; Kaufman, W; Whitterspoon, D; Wilson, E; Douglas, R. 1984. Effects of season, age and increased photoperiod on reproductive hormone concentrations and testicular diameters in Thoroughbred stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 4: 202-208

- Buzón, A. 2013. Análisis Cinético y Morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Veterinaria. Córdoba. España. Universidad de Córdoba. 172 p.
- Clay, C; Squires, E; Amann, R; Pickett, B. 1987. Influences of Season and Artificial Photoperiod on Stallions: Testicular Size, Seminal Characteristics and Sexual Behavior. *Journal of Animal Science*, 64: 517-525
- Coelho, D; Gazinelli, M; Freitas, F; Ribeiro, G; Borges, M; Nahas, I; Reis, R. 2015. Biometría Testicular e Mensurações das glândulas acessórias e ampolas do ducto deferente em garanhões da raça Mangalarga Marchador. *In VII Simpósio Internacional do Cavalo Atleta (7, 2015, Belo Horizonte, Brasil)*
- Cox, M. 2005. Caracterización andrológica de potros de raza Chilote. Tesis para optar al Título de Médico Veterinario. Valdivia. Chile. Universidad Austral de Chile. 78 p.
- Dascanio, J; McCue, P. 2014. *Equine Reproductive Procedures*. Estados Unidos. John Wiley & Sons, Inc., 560 p.
- Davis, R; Gravance, C; Casey, P. 1993. Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *American Journal Veterinary Research*, 54(9): 1808-1811
- Dextre, J. 2019. *Andar, Andar: Como disfrutar de un Caballo Peruano de Paso*. 2° ed. Perú. Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur, 212 p.
- Díaz, N. 2010. Características del Eyaculado Equino y variaciones estacionales. *Revisión Bibliográfica. Ciencia y Tecnología Ganadera*, 4(1): 23-30
- Dowsett, K; Pattie, W. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 32(1): 1-8

- Dowsett, K; Knott, L. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, 46(3): 397-412
- England, G. 2008. *Fertility and Obstetrics in the Horse*. 3° ed. Estados Unidos. Wiley-Blackwell, 320 p.
- Figueiró, G. 2010. Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça Crioula. Tesis para optar al Grado de Doctor. Rio Grande do Sul. Brasil. Universidade Federal de Santa Maria. 78 p.
- Forney, B; McDonnell, S. 1999. How to collect semen from stallions while they are standing on the ground. *In Proceedings of the 45th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 45: 142-144
- Gamboa, S; Rodrigues, A; Henriques, L; Batista, C; Ramalho-Santos, J. 2010. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 73(7): 950-958
- Gebauer, M; Pickett, B; Swiestra, E. 1974a. Reproductive Physiology of the Stallion III. Extra-Gonadal transit time and sperm reserves. *Journal of Animal Science*, 39(4):737-742
- Gebauer, M; Pickett, B; Swiestra, E. 1974b. Reproductive Physiology of the Stallion II. Production and Output of Sperm. *Journal of Animal Science*, 39(4): 732-736
- Goldman, D. 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*. 16:283

- Gravance, C. 2000. Assessment of Equine Sperm Mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53(9): 1691-1703
- Hafez, E. 1989. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 6° ed. México. McGraw-Hill/Interamericana, 542 p.
- Hillman, R; Olar, T; Squires, E; Pickett, B. 1980. Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioral characteristics of stallions. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 177(8): 720-722
- Horruitiner, K. 2000. Índices Reproductivos en yeguas de carrera en diferentes épocas de servicio. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Ica. Perú. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. 37 p.
- Hurtgen, J. 2009. Semen collection in stallions. *In: Samper, J. Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2° ed. Estados Unidos. Saunders. 336 p.
- Janett, F; Thun, R; Niederer, K; Burger, D; Hässig, M. 2003a. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*, 60(3): 453-461
- Janett, F; Thun, R; Bettschen, S; Burger, D; Hassig, M. 2003b. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Animal Reproduction Science*. 77:213
- Jasko, D; Lein, D; Foote, R. 1991. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology*. 35(2):317-327
- Jasko, D. 1992. Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, 8(2): 129-148

- Jasko, D; Little, T; Lein, D; Foote, R. 1992. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 200: 979-985
- Johnson, L; Thompson, D. 1983. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biology Reproduction*, 29: 777-783
- Johnson, L. 1991. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biology of Reproduction*. 44:284
- Jones, R; Squires, E; Slade, N; Pickett, W; Voss, J. 1984. The effect of washing on aerobic bacterial flora of the stallions's penis. *In Proceedings of the 30th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, p. 9-16
- Katila, T. 2001. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Veterinaria*, 42(2): 199-217
- Kavak, A; Lundeheim, N; Aidnik, M; Einarsson, S. 2003. Testicular measurements and daily sperm output of Tori and Estonian bred stallions. *Reprod. Domestic Anim*, 38: 167-169
- Kavak, A. 2004. Evaluation of sperm production, testicular measurements and post-thaw sperm quality in Tori and Estonian breed stallions. Tesis para optar a la Licenciatura. Uppsala. Suecia. Swedish University of Agricultural Sciences. 26 p.
- López, L; Zarco, L; Boeta, A. 2010. Inducción de la actividad ovárica en yeguas criollas con un programa de fotoperiodo artificial en la latitud 19°9'N. *Veterinaria México*, 41(2): 89-100
- Love, C. 1992. Ultrasonographic Evaluation of the Testis, Epididymis, and Spermatic Cord of the Stallion. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, 8(1): 167-182

- Love, C; Thompson, J; Brinsko, S. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology*, 60: 1127-1138
- MacLeod, J; McGee, W. 1950. The semen of the Thoroughbred. Estados Unidos. *Cornell Veterinarian* 40: 233
- Magistrini, M; Chanteloube, P; Palmer, E. 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 127-133
- Magistrini, M. 1999. L'Insémination artificielle chez les équins. *INRA Productions Animales*. 12:347
- Mansour, M. 2009. Modification of Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Integrity of Stallion Sperm Plasma. *Global Veterinaria*, 3(4): 302-307
- Metcalf, E; Ley, W; Love, C. 1997. Semen parameters of the American Miniature Horse stallion. In: *Proceedings of the 43th Annual Convention of the American Association of the Equine Practitioners*, p. 202-203
- McKinnon, A; Voss, L. 1993. *Equine Reproduction*. Estados Unidos. Ed. Lea y Febiger, 1137 p.
- Montalvo, M. 2019. Estudio de la Conducta Sexual y la Calidad Seminal en fresco en 3 Grupos Raciales en Equinos. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Loja. Ecuador. Universidad Nacional de Loja. 65 p.

- Muñoz-Alonso, L; Morales, F; Ortiz, R; Cruces, J; Briones, M; Saravia, F. 2016. Medición testicular en potros de raza Caballo Chileno enteros y castrados unilateralmente. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2): 303-308
- Naden, J; Amann, R; Squires, E. 1990. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallions. *Journal of Reproduction Fertility*, 88: 167-176
- Neild, D; Chaves, G; Flores, M; Mora, N; Beconi, M; Agüero, A. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51(4): 721-728
- Neild, D. 2013. Semen analysis methods and their relationship with equine fertility. *Spermova*, 3(2): 122-124
- Nie, G; Wenzel, J. 2001. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55(4): 1005-1018
- Nishikawa, Y. 1959 Semen properties and artificial insemination in horses. In: *Studies on Reproduction in Horses*. Japón. p. 208
- Paccamonti, D; Buiten, A; Parlevliet, J; Colenbrander, B. 1999. Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*, 51(7): 1693-1705
- Parlevliet, J; Kemp, B; Colenbrander, B. 1994. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101(1): 183-187
- Phetudomsinsuk, K; Sirinarumitr, K; Laikul, A; Pinyopummin, A. 2008. Morphology and morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, (50): 1

- Pickett, B; Sullivan, J; Seidel, G. 1975. Reproductive physiology of the stallion, V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *Journal of Animal Science*, 40: 917-923
- Pickett, B; Faulkner, L; Seidel, G; Berndtson, W; Voss, J. 1976. Reproductive physiology of the stallion, VI. Seminal and behavioural characteristics. *Journal of Animal Science*, 43: 617-625
- Pickett, B; Voss, J; Squires, E; Amann, R. 1982. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. Colorado State University Station. General Series N° 1005. 84 p.
- Pickett, B; Voss, J; Bowen, R; Squires, E; McKinnon, A. 1988. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proceedings American Association Equine Practitioners*, 485-518
- Pickett, B. 1993a. Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon, A.; Voss, J. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 755-768
- Pickett, B. 1993b. Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon, A.; Voss, J. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 809-820
- Pickett, B. 1995. The Stallion: Retrospective Analyses and Opinions. *Biology of Reproduction* 52: 547-564
- Pommer, A; Rutllant, J; Meyers, S. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58(7): 1373-1384
- Rigby, S; Varner, D; Thompson, J; Love, C; Brinsko, S; Blanchard, T. 2001. Measurement of Sperm Concentration in Stallion Ejaculates Using Photometric or Direct Sperm Enumeration Technique. *AAEP Proceedings*, 47: 236-238

- Rodríguez, H; Bustos-Obregón, E. 1996. Seasonality and freezability vs routine parameters in stallion semen. *Histology and Histopathology*, 11(2): 427-430
- Roser, J. 2000. Testicular function and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*. 20(2): 90-93
- Ruiz, C. 2002. Influencia del tiempo de refrigeración en la motilidad espermática e integridad de la membrana citoplasmática de semen diluído de Caballo Peruano de Paso. Tesis para obtener al Grado de Bachiller en Zootecnia. Lima. Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 49 p.
- Sánchez, A. 1992. Método para la evaluación de la fertilidad potencial y calificación reproductiva del potro. *Monografías de Medicina Veterinaria*. 14(2). Consultado 13 sep. 2021. Disponible en <https://revistas.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4993/4878>.
- Schmidt, K; Deichsel, K; de Oliveira, R; Aurich, J; Ille, N; Aurich, C. 2017. Effects of environmental temperature and season on hair coat characteristics, physiologic and reproductive parameters in Shetland pony stallions. *Theriogenology*, 97: 170-178
- Serres, C. 2012. Métodos Tradicionales y Alternativos de Extracción de Semen. In: I Congreso Solidario de Clínica Equina, p. 127-134
- Sisson, S. 1993. *Anatomía de los Animales Domésticos*. México. 5° ed. Salvat Editores S.A. v.1. 1335 p.
- Skinner, J; Bowen, J. 1968. Puberty in the Welsh stallion. *Journal of Reproduction and Fertility*. 16:133-135.
- Squires, E; Pickett, B; Amann, R. 1979. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27: 7-12
- Stout, T; Colenbrander, B. 2011. Reproductive parameters of draft horse, Friesian and warmblood stallions. In: McKinnon, A.; Squires, E.; Vaala, W.; Varner, D. *Equine Reproduction* 2° ed. Wiley-Blackwell. v.1. 1362-1366

- Sullivan, J; Pickett, B. 1975. Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23: 29-39
- Thompson, D; Pickett, B; Berndtson, W; Voss, J; Nett, T. 1977. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behaviour and concentration of LH and testosterone in serum. *Journal of Animal Science*, 44: 656-664
- Thompson, D; Pickett, B; Squires, E; Amann, R. 1979. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27: 13-17
- Varner, D. 1986. Collection and preservation of stallion spermatozoa. In: *Proceedings of the Annual Meeting (1986) of the Society of Theriogenology*. Society of Theriogenology. p. 13-33
- Varner, D; Schumacher, J; Blanchard, T; Johnson, L. 1991a. Diseases and management of breeding stallions. *American Veterinary Publications*. p. 349
- Varner, D; Schumacher, J; Blanchard, T; Johnson, L. 1991b. Breeding soundness examination. *In: Diseases and management of breeding stallions*. American Veterinary Publications. p. 61-96
- Vásquez, P. 2019. Influencia de la estación (invierno-primavera) sobre el volumen testicular y volumen del eyaculado en caballos inscritos en la Asociación de Criadores y Propietarios del Caballo Peruano de Paso de Lambayeque. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Lambayeque. Perú. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 79 p.
- Voss, J; Pickett, B; Squires, E. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 199(12): 1760-1761

- Weber, J. 2012. Avaliação do desenvolvimento testicular de equinos da raça Crioula no período da peri-puberdade. Tesis para optar al Grado de Maestro. Porto Alegre. Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 50 p.
- Wilson, K; Williams, Je; Montrose, V; Williams, Ja. 2019. Variance in Stallion Semen Quality among Equestrian Sporting Disciplines and Competition Levels. *Animals*, 9: 485
- World Health Organization. 2010. Laboratory Manual for the examination and processing of human semen. Suiza. 5° ed. World Health Organization, 271 p.
- Yates, D; Whitacre, M. 1993. Inseminación artificial en el equino. *In: Clínicas Veterinarias de Norteamérica: Práctica Equina: Reproducción*. Argentina. Ed. Inter-Médica, 231 p.
- Youngquist, R. 1997. Current Theraphy in Large Animal Theriogenology. Estados Unidos. Ed. W.B. Saunders Company, 478 p.
- Zhu, W; Liu, X. 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian Journal of Andrology*, 2: 135-138

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Resultados del diámetro escrotal y características seminales de los 14 potros del estudio

Características	Potros													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Diámetro escrotal (mm)	66	69	72	73	77	78	87	88	88	88	94	96	97	101
Volumen (cc)	93	44	73	59	104	43	75	31	41	38	52	98	102	47
Concentración (10 ⁶ /cc)	30	32	22	36	25	193	105	71	81	79	87	207	175	142
Motilidad (porcentaje)	34	71	48	55	80	27	79	38	60	39	50	72	50	28
Vitalidad (porcentaje)	69	76	92	79	93	62	90	85	82	89	65	80	78	51
Anormalidades (porcentaje)	33	39	32	28	27	16	25	27	25	30	21	15	29	32
Integridad de membrana citoplasmática (porcentaje)	50	66	48	61	82	70	78	69	47	48	82	60	45	52