

MÉTODOS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN

Dra. Consuelo Serres Dalmau

Hospital Clínico Veterinario

Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

La recogida de semen es una técnica habitual en la clínica de reproducción equina que se emplea para evaluar la capacidad reproductiva de los sementales, el control rutinario de la calidad del semen, el diagnóstico de la infertilidad y por su puesto la inseminación artificial ya sea con semen fresco, refrigerado o congelado. La inseminación artificial se ha desarrollado enormemente en los últimos años debido a las ventajas que aporta a la cría equina, podemos destacar el aumento del número de yeguas cubiertas por cada semental, la mejora de los índices de concepción de algunos sementales y yeguas subfértiles, la posibilidad de almacenamiento y transporte del semen y la disminución de los accidentes en los animales y las personas ocurridos durante la cubrición. Cuando se aplican en forma adecuada las técnicas actuales de inseminación artificial pueden dar como resultado tasas de concepción iguales o incluso superiores a las obtenidas mediante monta natural.

En la especie equina encontramos un número importante de problemas reproductivos asociados al semental, algunos de ellos están relacionados con la producción y calidad seminal y el análisis de semen es un arma imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de estos casos. En otros casos alteraciones de la libido, dificultades en la erección, la monta o la eyaculación e incluso problemas psíquicos pueden resultar factores limitantes que determinen una disminución de los parámetros reproductivos de la yeguada, y que deben ser también evaluados y tratados correctamente.

El método de elección para la recolección de semen en los caballos es la vagina artificial, la mayoría de los sementales pueden ser entrenados para eyacular en una vagina artificial, pero en algunos casos y por diversas razones debemos emplear otros métodos alternativos que nos permitan obtener y evaluar una muestra representativa de la producción seminal.

En este trabajo discutiremos brevemente el empleo de la vagina artificial y describiremos otras alternativas existentes para la recolección del eyaculado equino realizando una descripción de los casos en que está indicado su uso, el material y métodos necesarios para obtener el semen y las características del eyaculado obtenido.

1 VAGINA ARTIFICIAL

Como hemos indicado previamente la vagina artificial es el método de elección para la recogida del semen en los caballos, mediante esta técnica podemos obtener una muestra del eyaculado con las mismas características que el de una monta natural **(1,2,3,4,5,6)**. La mayoría de los sementales aceptan la vagina artificial sin que esto afecte a su comportamiento sexual pudiendo alternar recogidas y monta natural

Todas las vaginas artificiales consisten en una caja externa y un forro interno de látex entre los cuales se infunde agua tibia y/o aire para proveer la presión y temperatura adecuadas. Normalmente empleamos temperaturas de 40 a 42°C, cuando el caballo presenta problemas para eyacular es conveniente elevar ligeramente la temperatura del agua para mejorar el estímulo sobre el pene, en ningún caso se deben sobrepasar los 50°C, una temperatura demasiado elevada provocará el rechazo del caballo a la vagina; como en muchos otros aspectos encontraremos preferencias individuales respecto a la temperatura interna de la vagina. El grado de presión dentro de la vagina artificial también tiene un efecto directo en la eyaculación; debe ser suficientemente alta para permitir el contacto y la estimulación del pene pero no debe restringir la penetración o expansión del miembro a su estado de plena erección. Con sementales especialmente difíciles es conveniente usar un termómetro para controlar la temperatura interna y pesar la vagina artificial llena o llenarla con una bomba y un manómetro con el fin de que las condiciones no varíen entre recolecciones. En el momento previo a la recolección la vagina artificial se lubrica con una pequeña cantidad de gel estéril, debiéndose evitar los lubricantes bacteriostáticos ya que suelen ser spermicidas, una buena lubricación favorece la cópula y la eyaculación.

Existe una gran variedad de modelos de vaginas artificiales en el mercado, y los sementales pueden mostrar predilección por uno u otro modelo en función de sus características.

La vagina *Missouri* o *Nasco* es posiblemente la más común y está constituida por un forro de látex doble termosellado que forma una cámara donde se introduce el agua con una válvula que permite la introducción de agua y aire y una funda externa de cuero. Es económica, liviana y de fácil manejo, además permite una estimulación externa del glande del semental (efecto cérvix) o de la base del pene.

El Modelo *japonés* o *Nishikawa* está formado por una caja externa de aluminio y un forro de látex y en el extremo distal tiene una anilla de goma espuma para estimular el glande durante la penetración. Es rígida y cuenta con un bulbo de goma para la recogida del semen.

El *Modelo Roanoke* es parecido al japonés pero de material plástico y de tamaño más corto y es muy útil para sementales de pequeño tamaño.

Los modelos *Colorado*, *Lane* y *CSU* son muy similares, la carcasa externa es de plástico y usa dos forros de látex, con el primero se construye una cámara entre la carcasa externa y el forro donde se introduce el agua y el segundo forro sirve para la recolección colocando en su extremo distal el recipiente de recolección. La principal ventaja de estas vaginas es que mantienen la temperatura del agua durante mucho tiempo, pero son más pesadas y no permiten la estimulación manual del pene.

La vagina *Polaca* es un modelo abierto en su extremo distal lo que nos permite la recogida fraccionada del semen. Este método es usado en los Países del Este de Europa y permite recoger sólo los tres primeros chorros del eyaculado que contienen más del 70% de los espermatozoides. Este método de recogida precisa más operarios pero permite obtener eyaculados concentrados eliminando la necesidad de la centrifugación en la manipulación posterior.

Existen en el mercado camisas desechables para la mayoría de estos modelos lo que nos permite una recogida más higiénica pero, así como el látex es casi siempre bien tolerado, muchos caballos rechazan el tacto del plástico.

Para llevar a cabo la recolección necesitamos de una yegua en celo o de un maniquí, una vez que el semental monta a la yegua, el pene es desviado hacia un lado y dirigido hacia la vagina artificial. Generalmente la vagina artificial se mantiene inmóvil, con su extremo distal elevado y apoyada contra la yegua o el maniquí, en algunos casos puede requerirse un estímulo adicional que puede aplicarse comprimiendo el glánde (efecto cérvix), aplicando masajes o paños calientes en la base del pene o empujando la vagina hacia el caballo. La sensación de falta de estabilidad también puede inhibir la eyaculación en el caballo, debemos asegurarnos que la yegua o maniquí presentan un tamaño adecuado, y si se trata de un semental con problemas de estabilidad podemos ayudarlo colocando la yegua más baja, sujetando las extremidades anteriores o permitiéndole una zona de agarre con la boca. Durante la recolección el operador puede colocar sus dedos bajo la parte ventral del pene para detectar las pulsaciones uretrales de la eyaculación, en ese momento debemos bajar la parte distal de la vagina para permitir que el semen pase rápidamente al recipiente de recolección ya que el contacto del semen con el látex y la vagina caliente puede alterar la calidad de los espermatozoides.

El uso de un maniquí en lugar de la yegua provee de una monta más estable y reduce la variabilidad de las condiciones entre las recolecciones, reduciendo además el riesgo de accidentes para los animales y los operadores. Si la falsa yegua es de altura ajustable se puede acomodar a sementales de diferente alzada y mejora mucho la

estabilidad de los caballos con alteraciones de las extremidades posteriores, del dorso o con incoordinación.

La utilización del maniquí requiere un periodo de entrenamiento, inicialmente se coloca una yegua en estro junto al maniquí como estímulo sexual y tras varias recogidas y una vez que el macho asocia el maniquí con la monta y la eyaculación la hembra puede ser alejada y eventualmente se podrá prescindir de ella.

Existe un modelo nuevo de maniquí, el modelo Equidame[®] phantom **(7)**, que lleva incorporada una vagina artificial abierta en su interior y un sistema computerizado para la recogida de las distintas fracciones.

2 PRESERVATIVO

El preservativo se emplea cuando no se dispone de vagina artificial o bien el caballo no la acepta. El preservativo se coloca sobre el pene en erección y debe recuperarse inmediatamente después de la cubrición evitando que caiga al suelo. La muestra obtenida mediante el preservativo es completa y representativa, sin embargo debemos tener en cuenta que está más contaminado con bacterias y detritus del exterior del pene que el recolectado en vagina artificial y además el contacto prolongado de los espermatozoides con el látex puede alterar su motilidad, por estas razones y la incomodidad en su uso no debe ser empleado como primera opción para la obtención del semen **(1)**.

No todos los caballos aceptan la manipulación necesaria para la colocación del preservativo o consiguen eyacular en él, en nuestra experiencia la mayoría de los caballos que rechazan la vagina artificial tampoco consiguen eyacular en un preservativo.

3 MASTURBACION

La masturbación consiste en realizar la recogida del semen mediante el masaje del pene del caballo, normalmente con éste en estación sobre sus cuatro extremidades. Este tipo de recolección lleva consigo una labor ardua durante el periodo de entrenamiento pero suele ser bien aceptado por los animales y es muy práctico y eficaz una vez que el semental está acostumbrado **(8)**.

La técnica consiste en colocar al semental en un potro de contención y excitarlo con una yegua en celo, con el pene en erección se coloca una bolsa sobre el glande y con unas compresas atemperadas a 45 °C colocadas una en el glande y otra en la base

del pene masajear hasta que se produce la eyaculación. Otras variaciones de la misma técnica emplean la vagina artificial para estimular el pene o permiten la monta del animal sobre una yegua o un maniquí tomando entonces el pene y masajeándolo con el caballo en posición bípeda.

Esta técnica es de elección en caballos con problemas del aparato locomotor que les impidan o dificulten la monta o con problemas como ataxia o incoordinación ya que permite que la eyaculación se realice en una postura mucho más estable. Presenta también otras muchas ventajas, por ejemplo, la muestra que se obtiene es perfectamente representativa y la contaminación es mínima, se puede realizar además la recogida fraccionada del semen y requiere un equipamiento mínimo y una sola persona como recolector. Una vez el semental ha sido entrenado se puede repetir con la frecuencia necesaria sin afectar al comportamiento sexual del animal. **(4,5,6)**.

4 COLECTOR CERVICAL

El Colector Cervical consiste en un recipiente de cristal soplado de Borosilicato, de un grosor constante de 2,2 a 3mm, realizado mediante la técnica de soplado de cristal en su punto de fusión, en el que se aprecian con 3 partes diferenciadas:

- La boca
- La ampolla
- El cuerpo del colector

El colector cervical debe ser introducido a través de la vagina en el cérvix de la yegua en celo, por su extremo alargado que corresponde al cuerpo del colector que tras ser introducido, debe presionarse sobre la ampolla para producir la dilatación del cérvix y la introducción de esta de manera que obture completamente la entrada de semen en el útero. Por último la boca del colector debe ser cubierta completamente por los labios del cérvix para impedir que el semental detecte la presencia de este durante la cubrición.

- Según la empresa comercializadora (www.colectorcervical.com) No se encuentran diferencias microbiológicas significativas entre las recogidas realizadas con vagina artificial y colector cervical, obteniendo valores de gestaciones y partos con este método, de la misma índole que los obtenidos con vagina artificial. Pero hay que destacar que como existe cópula no impide la transmisión de enfermedades venéreas.
- Es útil para sementales en los que la vagina artificial y el preservativo no han sido eficaces; debido a que el semental no detecta nada diferente a la monta natural. También está descrito su uso para équidos salvajes o exóticos.

- El número de personas, tiempo, y coste económico es muy pequeño, y la versatilidad del método permite que se realice en condiciones de campo.

5 EXCOPULA

Consiste en la utilización de fármacos para provocar la eyaculación de los sementales y puede ser una alternativa a problemas como la falta de libido o problemas de erección, monta o eyaculación. A pesar de los numerosos estudios realizados en este campo todavía no están muy claras las vías nerviosas y los receptores que la desencadenan. De las distintas teorías, parece que la más apoyada es la que la eyaculación está mediada por receptores alfa adrenérgicos. En la bibliografía podemos encontrar descrito el uso de varios fármacos a fin de provocar la eyaculación excopula en equidos:

-Xilacina **(9,10)**

-Clomipramina hydrochloride; en combinación con xilacina.

-Imipramina; en bajas dosis en équidos produce erección y masturbación. **(10)**

-Imipramina en combinación con xilacina. **(10,11,12,13,14)**

-Detomidina. **(15,16)**

-Prostaglandinas

-HCG en combinación con Prostaglandinas (Miró, 2011 comunicación personal)

Un tratamiento de imipramina oral (3 mg/kg), seguido de una dosis de xilacina intravenosa 2 h después (0.66 mg/kg). Consiguió en un intervalo entre 1.2 y 14 min. un mayor porcentaje de eyaculaciones que en estudios anteriores (68%). Los eyaculados fueron de bajo volumen, alta concentración espermática y un alto número de espermatozoides totales (mayor que en recogida con vagina artificial) **(17)**.

Para la recogida necesitamos un ambiente muy tranquilo para los sementales, la excitación previa está descrita por algunos autores que produce un aumento de recolecciones.

Una vez decido el producto y la dosis a usar, se inyecta el fármaco y permaneceremos en silencio cerca del semental, agachados y con un recipiente de recogida de boca amplia. En poco tiempo, unos 10 min, se produce la protusión o erección; la eyaculación se produce independientemente a éstas entre los diez minutos y media hora después de la aplicación del fármaco.

En un estudio realizado por nuestro equipo se han utilizado varios agonistas de receptores alfa2 adrenérgicos para provocar la eyaculación excópula y comparar la

calidad seminal de estos eyaculados **(15)**. Los fármacos usados fueron detomidina, romifidina y xilacina al 50%, 75% y 100% de la dosis de tranquilización.

-xilacina (1,1mg/ Kg p.v.)

-detomidina (2 mg/ 100Kg p.v.)

-romifidina (80 ng/ 100 Kg p.v.)

Obteniendo como resultado un 12,5% de eyaculaciones con la detomidina, un 25% con la romifidina y un 37,5% con la xilacina. En cuanto a la calidad seminal sólo el volumen y la concentración seminal presentaron diferencias significativas con los valores seminales obtenidos de los mismos sementales con vagina artificial. Siendo el volumen significativamente menor y la concentración mayor en la eyaculación excópula, pero permanecieron sin diferencias el número total de espermatozoides y la motilidad tanto total como progresiva. Según nuestra experiencia la fertilidad del semen obtenido con este sistema de recogida es similar al del semen obtenido con vagina artificial y existen referencias bibliográficas que así lo indican. **(13, 14, 16)**

6 EXTRACCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CONDUCTO EPIDIDIMARIO

Los espermatozoides de epidídimo pueden obtenerse post mortem o tras una castración, de hecho, el primer potro nacido de semen congelado se obtuvo a partir de espermatozoides de epidídimo (18). Se sabe que después de la muerte de un semental los espermatozoides del epidídimo permanecen viables durante un tiempo antes de que les afecte la descomposición (24 horas tras castración a Tº ambiente) (19).

Para la obtención de los espermatozoides se disecciona el epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente, posteriormente se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con un diluyente adecuado. Hay que tener en cuenta que en la cabeza del epidídimo se eliminan los fluidos sobrantes del espermatozoide inmaduro, en el cuerpo los espermatozoides comienzan a tener capacidad fecundante y en la cola donde fundamentalmente se almacenan espermatozoides maduros

Los espermatozoides obtenidos mediante este sistema pueden presentar un cierto grado de inmadurez, se caracterizan por la presencia de un gran número de gotas citoplasmáticas y una baja motilidad. Cuando la recolección se realiza postmortem el estado de las células suele ser muy deficiente, ya que los espermatozoides son especialmente sensibles a la hipoxia, la acción de los fármacos y la endotoxemia, por

ello la obtención de semen en animales muertos por cólico o enfermedades que han precisado tratamientos farmacológicos puede no obtener buenos resultados (8, 20).

5 ELECTROEYACULACIÓN

Utilizando un electroeyaculador que produce descargas eléctricas de diferente intensidad y con frecuencia programable se excitan las vesículas seminales pudiéndose obtener un eyaculado. Esta técnica es muy utilizada en otras especies como en el vacuno o en especies salvajes para creación de bancos genéticos (8) pero en los équidos produce un gran sufrimiento que incluso puede llegar a la muerte del semental (11, 21). Además la muestra recogida es de peor calidad o puede resultar contaminado con orina (22) por lo que es mucho más conveniente el uso de otras técnicas como la recolección manual o la vagina artificial.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Yates, D. J.; Whitacre, M. D. Inseminación artificial en el equino. In: Veterinary Clinics of North América. (Equine practice). By: W. B. Saunders Company. Eds. Intermedica. Philadelphia: 1993, vol 4; nº 2, 173-192.
- 2.- Gómez- Cuétara, C. Manejo del Semental. En: Equino Aspectos De Cría Y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General De Colegios Veterinarios De España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, 1996, vol XVIII, 61-80.
- 3.- Mateos, E. Biotecnología de la Reproducción Equina. En: Equino Aspectos De Cría Y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General De Colegios Veterinarios De España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, 1996, vol XVIII, 81-100.
- 4.- Crump. J.; Crump. J. Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. Theriogenology 1989; 31: 341-346.
- 5.- Mc Donnell S. M.; Love, C. C. Manual stimulation collection of semen from stallion: Training time, semen quality, and sexual behavior. Theriogenology 1991; 33: 1201-1205.
- 6.- Mc Donnell S. M.; Pozor, M. A.; Beech, J.; Sweeney, R. W. Use of manual stimulation for collection of semen from an atactic stallion unable to mount. J. A. V. M. A. 1991; 199: 753-754.
- 7.- Lindeberg, H.; Karjalainen, E.; Koskinen and Katila. Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame®) versus a Missouri® artificial vagina. Theriogenology 1999; 51:1157-1173.
- 8.- Crump. J.; Crump. J. Manual semen collection from a Grevy`s Zebra stallion (Eguus grevyi) onset of sperm production. Semen characteristics, and cryopreservation of

semen, with a comparison to the sperm production from a Grant's Zebra stallion (*Equus burchelli boehmi*). *Theriogenology* 1994; 41:1011-1021.

9.- Mc Donnell S. M.; Love, C. C. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 1991; 36: 73-76.

10.- Mc Donnell S. M. Pharmacologic manipulation of sexual behavior. In: Mc Kinnon AO, Voss JL; eds. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea Febiger, 1993: 825-830.

11.- Mc Donnell, S. M.; Odian, M. J. Imipramina and Xilazine-induced ex copula ejaculation in stallion. *Theriogenology* 1994; 41: 1005-1010.

12.- Clire, E. C.; Stephen, T. M.; Bowman, P.; Leibel, T. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation a disabled stallion. *Can. Vet. J.* 1997; 38: 171-174.

13.- Card, C.E. Pregnancies from imipramine and Xylazine-induced *ex copula* ejaculation in a disable stallion. *Can Vet J.* 1997; 38: 171-174.

14.- Johnson, P. F. Chemical ejaculation of stallion after the administration of oral imipramine followed by intravenous Xylazine, in *Proceedings. Society for Theriogenology.* 1998; 59-62.

15.- Blanco, M.; Serres, C.; Del Rio, A.; López, J.; Sánchez, J.; Meikle, A.; Gómez-Cuétara, C.; Mateos, E. Métodos farmacológicos para la inducción de la eyaculación ex cópula en équidos. I Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Lisboa. 1997; II:32-37.

16.- Rowley, D. D.; Lock, T. F.; Shipley, C. F. Fertility of Detomidine HCl-induced ex copula- ejaculated stallion semen after storage at 5°C. *AAEP Proceedings.* 1999; 45: 221-223.

17.- McDonnell SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. [Anim Reprod Sci.](#) 2001 Dec 3;68(3-4):153-9.

18.- Barker C. A. V. and Gandier J. C. C. Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa *Can J Comp Med Vet Sci.* 1957 February; 21(2): 47-51.

19.- Muradas, P.R.; Weiss, R.R.; Kozicki, L.E, Granemann, L.C.; Santos I.W.; Pimpão, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificia e por lavagem da cauda do epididimo. *Arch. Vet. Sci.* 2006; 11:69-74.

20.- Braun, J.; Sakai, M.; Hoch, S.; Oguri, N. Preservation ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 1994; 41: 809-818.

21.-Stover, J.; Seager, S.W.J; Dolensk, E.P.; Doherty, J.; Wildt, D.F.; Platz, C.C. Electroejaculation and semen evaluation of Przewalski horse (*Equus przewalski*). *Am Assoc Zoo Vet.*1981; 144-145.

21. Cary, J.A.; Madill, S.; Farnsworth, K, Hayna, J.T; Duoos, L. Fahning, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm Collection techniques in stallions. *Can. Vet. J.* 2004; 45:35-41.

<p>Table 1 Summary of pharmacologically-induced-ejaculation regimens or stallion and rates of success (McDonnell, 2001)</p>
--

	Regimen	Rate of ejaculation (number of stallions)
Xylazine 0.66 mg/kg i.v. 27% (<i>n</i> = 28) McDonnell and Love, 1991 - laboratory study		
Detomidine Rowley et al., 1999 - 0.02 mg/kg i.m. followed by 0.01 - 50% (<i>n</i> = 1) laboratory study mg/kg 15 min later		
Imipramine McDonnell and Turner, 1994 - 2 mg/kg i.v. 42% (<i>n</i> = 5) - laboratory study		
Imipramine followed by Xylazine McDon-2 mg/kg imipramine i.v. followed 10 min 33% (<i>n</i> = 8) -nell and Odian, 1994 (laboratory study) later with 0.3 mg/kg i.v. xylazine		
McDonnell and Turner, 1994 - 2 mg/kg imipramine i.v. followed 60 min 53% (<i>n</i> = 5) laboratory study later with 0.3 mg/kg i.v. xylazine		
Johnston and DeLuca, 1998 (farm practice) 0.75-2.0 mg/kg p.o. followed 1-3 h later 57% (<i>n</i> = 6) with 0.3 mg/kg i.v. xylazine		
Prostaglandin F2a McDonnell 1992 - 0.01-0.15 mg/kg i.m. (individual stallion 75% (<i>n</i> = 8) laboratory study titration trials		