

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN ANDROLÓGICA DE POTROS DE RAZA CHILOTA**

Memoria de Título presentada como parte de  
los requisitos para optar al **TÍTULO DE**  
**MÉDICO VETERINARIO**

**MARÍA ALEJANDRA FRANCISCA COX LEIXELARD**

**VALDIVIA-CHILE**

**2005**

**PROFESOR PATROCINANTE**

**Renato Gatica G.**

---

**Nombre**

**Firma**

**PROFESOR COLABORADOR**

**Jorge Rubilar**

---

**Nombre**

**Firma**

**PROFESORES CALIFICADORES**

**Oscar Araya**

---

**Nombre**

**Firma**

**Mario Martinez**

---

**Nombre**

**Firma**

**FECHA DE APROBACIÓN**

**11 de enero 2005**

---

## 2. INDICE

<b>3. RESUMEN</b>	1
<b>4. SUMMARY</b>	2
<b>5. INTRODUCCIÓN</b>	3
5.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EXAMEN MACROSCÓPICO	4
5.1.1. Volumen libre de gel	4
5.1.2. Color	5
5.1.3. Apariencia	5
5.1.4. Olor	5
5.1.5. pH	5
5.2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EXAMEN MICROSCÓPICO	5
5.2.1. Motilidad Progresiva	5
5.2.2. Motilidad Total	6
5.2.3. Motilidad de Masa	6
5.2.4. Intensidad de Movimiento	6
5.2.5. Concentración Espermática	6
5.2.6. Tinción de Blom	7
5.2.7. Morfología	7
5.3. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL	7
5.3.1. Edad	7
5.3.2. Sanidad	8
5.3.3. Raza	8
5.3.4. Estación del año	9
<b>6. MATERIAL Y METODO</b>	10
6.1. EXAMEN CLÍNICO GENERAL	10
6.2. EVALUACIÓN DEL SEMEN	10
6.3. MEDICIÓN DE LOS TESTÍCULOS	12
6.4. EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DE LAS GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS	12
6.5. ESQUEMA DE TRABAJO	13
<b>7. RESULTADOS</b>	14

7.1. EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES	14
7.2. EVALUACIÓN DEL SEMEN	14
7.2.1. Características macroscópicas del semen	14
7.2.2. Características microscópicas del semen	15
7.3. TESTÍCULOS	15
7.4. GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS	17
<b>8. DISCUSIÓN</b>	19
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	22
<b>ANEXOS</b>	25

### 3. RESUMEN

#### “Caracterización Andrológica de los potros de raza Chilota”

El caballo Chilote ha adquirido especial relevancia en los últimos años, debido al descubrimiento de que pertenece a una raza distinta a la del caballo Criollo Chileno, y que no forma parte de una variación de éste, como se pensaba antes.

Este estudio se realizó en un haras de la Décima Región, Chile, y se emplearon seis potros de fertilidad probada y una yegua inducida a estro hormonalmente (ECP®) para facilitar las recolecciones de semen. Además, se usó material de laboratorio, una vagina artificial y un equipo de ultrasonido. El análisis se llevó a cabo en los meses de Julio y Agosto del año 2002, es decir, durante el período de actividad no reproductiva.

Se procedió a obtener muestras de semen, las que fueron analizadas tanto macroscópicamente (volumen, olor, color, pH y apariencia), como microscópicamente (concentración, motilidad progresiva, motilidad de masa, intensidad de movimiento, porcentaje de espermatozoides muertos, y malformaciones). Se midieron los testículos, con el fin de aproximar su volumen. Se observaron y midieron las glándulas sexuales accesorias (GSA) por ultrasonografía.

Los resultados obtenidos indican que el semen de los potros Chilotes tiene una alta concentración con relación al de potros de otras razas de mayor tamaño, en tanto que el volumen seminal es notoriamente inferior a los parámetros aceptados en las pruebas de fertilidad potencial de otras razas. El tamaño testicular por su parte varió entre los potros siendo además de menor volumen que en los de razas grandes. Concordante con esto, las GSA son de menor tamaño que las descritas para razas mayores. Otras características, como motilidad y morfología, variaron levemente de los parámetros normales aceptados, las que podrían explicarse dado que los animales se encontraban fuera de la época de actividad sexual, por lo que el metabolismo espermático se muestra deprimido.

Como conclusión, puede afirmarse que los potros chilotes –andrológicamente– presentan un semen de menor volumen, pero que alcanza una alta concentración de células espermáticas, logrando un buen número de células espermáticas totales por eyaculado, lo que podría deberse a que el tamaño testicular es mayor, en relación al tamaño corporal que en las razas más grandes, y a que las glándulas sexuales accesorias, al ser más pequeñas, tienen una menor producción de plasma seminal, logrando así un semen con mayor concentración de células espermáticas por ml.

Palabras Claves: Chilote, potro, semen, testículos y GSA.

#### 4. SUMMARY

##### “Andrological characterization of the Chilote breed stallions”

Chilote horses have become very important on the last years, because the discovery of that they belong to a breed, different of the Chilean Criollo, horse and it is not a degeneration of this one. Another situation that has surprised us of this specials *ponies*, is that their body type is different from the other small-size equines. In fact, their arms and legs are thin, a not common characteristic for this type of horses .

This study was carried out in a horse breeding farm of the  $X^{th}$  , Chile, region using 6 stallions of proven fertility, and a mare hormonally induced in estrus using ECP™ to make easier the semen recollection. Also was used laboratory material, an artificial vagina and an ultrasound equipment. This analysis was performed on the months of July and August of 2002, during the low sexual activity period.

The study started obtaining semen samples that were evaluated macroscopically (volume, smell, color, pH and appearance), and microscopically (sperm concentration, progressive motility, mass motility, intensity of motility, dead sperm percentage and morphology). The testicular measurements from the stallions were obtained with the objective of calculate the volume. The accessory sex glands (ASG) were ultrasonographically evaluated.

The results seems that the semen of these stallions have a high sperm concentration compared with the full-size horses, but the volume was lower than is commonly accepted as normal in full-size stallions. The testicular size varied among the stallions being the small testis in the smaller horses. The ASG were smaller in the smaller horses. Other characteristics like motility and morphology had a very little variation from the normal accepted parameters, they could be explained because these animas were in a rest period, in which their sperm metabolism is depressed.

In conclusion, Chilote stallions present a low volume semen, but a very high concentration because the testis size in relation with the body weight, are bigger than that in the full-size stallions, and as the ASG are smaller, the semen had a lower plasma production and a high sperm concentration because produces low seminal plasma.

Key words: Chilote, stallion, semen, testicles and ASG

## 5. INTRODUCCIÓN

El caballo Chilote es un ejemplar auténticamente “criollo”, descendiente de caballos traídos por los conquistadores españoles en los siglos XVI y XVII, y reproducidos con ninguna o muy pocas cruizas con otras razas. El mantenimiento de este genotipo en forma relativamente pura se debió a la condición insular del archipiélago de Chiloé Lyon (2003).

Estos equinos fueron por mucho tiempo desconocidos como raza pura equina, encontrándose en grave peligro de extinción. Anteriormente se creía que este caballo de baja alzada y estilizado era la misma raza que el caballo Criollo Chileno, pero que constituía una degeneración de éste. Sin embargo, a raíz de estudios genéticos comparados efectuados en los años 90 por investigadores de la Universidades de Kentucky de Estados Unidos y Austral de Chile, se determinó que era otra raza que se mantenía pura desde sus orígenes, lo que la hace singular en el mundo Lyon (2003).

Dentro de las características fenotípicas de esta raza destaca la alzada de sus ejemplares, la que no es superior a 1,25 metros. Los miembros, tanto anteriores como posteriores son finos, lo que es una característica especial para los caballos de razas pequeñas Lyon (2003).

El objetivo de la evaluación andrológica de un potro es conocer su libido, habilidad de monta y la calidad seminal, es decir, su “fertilidad potencial” (Hurtgen, 1983; Davies, 1999). En cuanto a la fertilidad real, la mejor forma de medirla es conocer la tasa de parición cuando un semental ha sido sometido a monta de un cierto número de yeguas bajo recomendadas condiciones de servicio, teniendo presente que estos resultados estarán determinados también por la fertilidad de la hembra (Hurtgen, 1983). En estado natural, se ha observado que un potro que permanece con un grupo de hembras, que varía entre 5 y 15 aproximadamente, logra un porcentaje de preñez de entre un 90 a 95% por temporada, y un 60% al primer servicio (Díaz, 1995).

Para la evaluación de un posible reproductor es necesario realizar un examen andrológico, el que consta básicamente de tres partes: examen clínico general, examen clínico de los órganos reproductivos, y la evaluación del semen (Hafez, 1987).

En el examen clínico general se identifica al animal, y se determinan distintos factores, como la capacidad de montar del animal, la edad, ya que es un aspecto muy influyente en la fertilidad (Hess y Roser, 2001), se realiza una evaluación de su estado general y se determina si cuenta con las condiciones básicas para ser destinado a la reproducción (Hurtgen, 1983).

Dentro del examen de los órganos reproductivos se debe realizar una evaluación de los testículos y de las glándulas sexuales accesorias. La medición del testículo, con el fin de aproximar su volumen, es considerada una prueba de relevancia, ya que éste va en directa

relación con la cantidad de parénquima testicular presente, el que a su vez determina la producción potencial de espermatozoides. Paccamonti y col. (1999). De esta manera se han estandarizado algunas medidas para sementales de talla grande, entendiéndose por esto, caballos FSC o de deporte ecuestre, obteniendo un rango de 6 a 12 cm. de largo, 4 a 7 cm. de alto y 5 cm. de ancho. Rossdale (1991) y Paccamonti y col. (1999). Debido al actual incremento en el número de caballos de talla pequeña en el mundo, se ha ampliado la información para estas razas. Paccamonti y col. (1999) señalan que el número total de espermatozoides por eyaculado en los potros de raza pequeña es en promedio de  $4,59 \times 10^9$ . Según Sisson y Grossman (1995), el tamaño de los testículos varía entre las distintas razas, y en el mismo padrillo, generalmente el testículo izquierdo es levemente de mayor tamaño.

Las glándulas sexuales accesorias (GSA) de un reproductor están formadas por las ampollas de los conductos deferentes, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Thompson y col. (1980), Weber (1989). La importancia de evaluarlas se basa en que una de las principales causas de infertilidad en los potros está dada, precisamente, por alteraciones que afectan a alguna de ellas. Behn (1991). En un estudio realizado a potros de distintas razas, en que se establecieron valores de referencia para las GSA, señalan que las medidas eran similares para los potros de raza pequeña, de razas livianas y pesadas, y a su vez que no había diferencias significativas entre las glándulas del lado derecho y las del lado izquierdo. Pozor y McDonnell (2001).

El examen del semen es un punto de importancia indiscutible, ya que mediante pruebas de fertilidad potencial se puede realizar una estimación de la capacidad fecundante de éste (Díaz y Arancibia 1971). Rousset y col. (1987), señalan que hay variaciones considerables en la calidad del semen entre e intra potros, por lo que sugieren obtener más de una muestra para la evaluación de la fertilidad de un reproductor. Dentro de las características del semen de potro, Díaz (1995), explica que el eyaculado está constituido básicamente, por tres partes. La primera fracción es acuosa y prácticamente libre de espermatozoides, la segunda, en cambio, es rica en espermatozoides y representa aproximadamente el 45 % del total del eyaculado y el 75% del total de los espermatozoides, y la tercera corresponde a la fracción gel, es pobre en espermatozoides.

## **5.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL EXAMEN MACROSCÓPICO A DETERMINAR**

### **5.1.1. Volumen libre de gel:**

Jasko (1983) señala que aunque el volumen de un eyaculado no es un buen predictor de la fertilidad de un padrillo, su medición es muy importante para estimar el número total de espermatozoides. Por otro lado, Dowsett y Pattie (1982) afirman que características como el volumen libre de gel, la concentración espermática, el número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos, están claramente relacionados con el porcentaje de preñez por servicio. Smith (2001) indica que el volumen del eyaculado de un potro de edad maduro (5 a 14 años), y talla grande, varía en un rango



de entre 50 a 150 ml, aunque Jasko (1983) considera normales valores que fluctúen entre 20 y 150 ml, con una media de 45 ml.

### **5.1.2. Color:**

El color del semen puede dar una indicación de la concentración espermática. Así, un eyaculado de color blanco amarillento, frecuentemente, representa una concentración de entre 250 y 500 millones de células espermáticas por ml (Smith, 2001).

### **5.1.3. Apariencia:**

La apariencia de un eyaculado, al igual que el color de éste, es indicativo de la concentración espermática Hafez (1987). Para Jasko (1983) el semen fresco de un potro puede tener una apariencia acuosa o lechosa, la que estará influenciada por la concentración de células espermáticas, siendo la de aspecto lechosa de mayor concentración que la acuosa. Hafez (1987) señala que la apariencia de un eyaculado debe ser uniforme, y que la muestra debe estar libre de suciedad, sangre y otros contaminantes.

### **5.1.4. Olor:**

El olor de un eyaculado se considera *sui generis*, es decir, el olor típico del semen según la especie Hafez (1987). Olores extraños o atípicos de éste pueden deberse a contaminación de la muestra.

### **5.1.5. pH:**

El pH de una muestra de semen debe ser determinado inmediatamente después de la recolección, ya que el metabolismo espermático produce una disminución de éste a medida que pasa el tiempo. El rango normal del pH, varía entre 6.9 y 7.6, siendo las muestras de menor pH las de mayor concentración espermática por los ácidos secretados a nivel del epidídimo Jasko (1983). Smith (2001) indica que si el semen es altamente alcalino y hay presencia de abundantes células de la línea blanca puede ser un indicativo de la presencia de una infección del tracto reproductivo del macho.

## **5.2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS SEMINALES EVALUADAS EN EL EXAMEN MICROSCÓPICO**

### **5.2.1. Motilidad Progresiva:**

Es considerada una prueba fundamental de laboratorio para estimar la capacidad fecundante de un eyaculado Varner (1997), Squires y col. (1999), Combes y col. (2000). Para McDonnell (1983) y Brinsko y col. (2000), la estimación visual del porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo (aquel movimiento caudo-cefálico a través del campo) tiene gran influencia sobre la capacidad fecundante de un eyaculado, ya que sólo las células con movimiento progresivo podrán producir la fecundación.

### **5.2.2. Motilidad Total:**

La evaluación de la motilidad total de un eyaculado es una prueba realizada comúnmente debido a la simpleza de su técnica Hafez (1979). Esta prueba presenta una alta correlación con la prueba de tinción de Blom (vivos/muertos) ya que se entiende que si las células espermáticas presentan movimiento, están vivas. Casey y col. (1993). Por su parte Graham (1996) señala que el porcentaje de espermatozoides móviles, evaluados en forma visual, no tiene una alta correlación con la fertilidad, debido a que un porcentaje de éstos presenta movimientos oscilatorios (solo movimiento de la cola, logrando un movimiento circular), haciéndolos incapaces de fecundar el ovocito.

### **5.2.3. Motilidad de Masa:**

Esta prueba es de gran uso en la congelación de semen bovino, y no está descrita en la evaluación seminal en equinos. Por otra parte, estudios preliminares indican que los potros de raza Chile presentan una concentración espermática que permitiría observar movimiento de masa\* Este movimiento podría considerarse como la suma de las dinámicas individuales de cada espermatozoide de un eyaculado Díaz y Arancibia (1971), y está determinado por la motilidad total y la concentración espermática. Para la evaluación de este movimiento se utiliza la escala descrita por Diaz y Arancibia (1971), la que va de 1 a 4, siendo 1 la ausencia total de movimiento y 4 un movimiento muy activo con formación de ondas.

### **5.2.4. Intensidad de Movimiento:**

Para Varner y Schumacher (1998) la intensidad de movimiento es una prueba que debe ser realizada junto con la evaluación de la motilidad progresiva y de la motilidad total de un eyaculado, con el fin de conocer la velocidad del movimiento de sus espermatozoides, la que estaría relacionada con la vitalidad de éstos. La escala utilizada para esta prueba es la descrita por Varner y Schumacher (1998), en que 0 es la ausencia de movimiento y 4 es un movimiento enérgico por parte de los espermatozoides.

### **5.2.5. Concentración Espermática:**

La cantidad de células espermáticas es un punto importantísimo de determinar, debido a que ésta es una característica seminal altamente variable Hafez (1987). Para el cálculo del número total de espermatozoides es necesario multiplicar la concentración espermática obtenida por el volumen del eyaculado Hafez, (1987) y Varner y Schumacher, (1998).

Los potros, dentro de los animales domésticos, son los que acusan un mayor grado de variabilidad natural en relación a la concentración espermática de sus eyaculados Díaz y Arancibia (1971). Díaz y Arancibia (1971) determinan un valor medio de 210.000 espermatozoides/mm<sup>3</sup>, con rangos de 25.000 a 550.000 células por mm<sup>3</sup>. en caballos fina sangre de carrera (FSC)

---

\* Rubilar 2000. Comunicación personal

La determinación de la concentración espermática se puede precisar de dos maneras, una es mediante la utilización de un hemocitómetro o cámara de Neubauer, el que es considerado un método barato y seguro. La cámara consta de una placa de vidrio la que tiene una profundidad de 0,1 milímetro. La cámara está dividida en dos porciones, cada una de las cuales se encuentra parcializada en 25 cuadrados de 0,1 mm<sup>3</sup>. La otra forma de calcular la concentración espermática es el densocitómetro, el que es básicamente un espectrofotómetro.

### **5.2.6. Tinción de Blom**

Díaz y Arancibia (1971) señalan que la técnica a utilizar es la de Bloom (eosina-nigrosina), para determinar la cantidad de espermatozoides muertos en el semen del potro, esto es, eosina positivo, es decir, las células que captan la eosina y se tiñen de color rosado por la alteración de la membrana.

### **5.2.7. Morfología:**

La evaluación de la morfología de las células espermáticas es un procedimiento de rigor en el examen de fertilidad potencial de un potro Love y col. (2000). La tinción de elección es la técnica de Karras, y esto está relacionado con el hecho de que con esta técnica se pueden ver con bastante facilidad las anomalías a nivel de cabeza, cuello, tracto intermedio y cola (Díaz y Arancibia, 1971). En relación a este punto, Casey y col. (1996) sugieren que los potros subfértiles presentan un mayor número de espermatozoides anormales que los potros fértiles. Entre las anomalías se incluyen alteraciones a nivel de la cabeza, del tracto intermedio, de la cola y presencia de gota citoplasmática. Determinar qué anomalías específicas afectan la fertilidad del potro no está claro, pero sí que ciertas alteraciones, como las que afectan la cabeza y la pieza media, pueden ser más perjudiciales para la fertilidad que las otras. Jasko y col. (1990). Anomalías en el acrosoma del espermatozoide están asociadas a una falla en la espermatogénesis, y producen una disminución en la fertilidad, e incluso, la infertilidad, asociándose también a descanso sexual prolongado (Hurtgen y Jonson; 1982).

## **5.3. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL**

### **5.3.1. Edad:**

La edad es un importante factor a considerar al momento de realizar un examen andrológico, dado que algunas características del eyaculado van cambiando en relación a la edad, así, por ejemplo, el volumen total del eyaculado en un macho de 1 a 2 años es diferente al de un potro de 10, siendo este último de mayor volumen y de una concentración espermática mayor, Dowsett y Knott (1996) y Davies (1999). En relación a esto, Fukuda y col. (2001) describen en un estudio realizado a 8 potros entre 4 y 24 años, que en los de mayor edad pueda observarse atrofia de los túbulos seminíferos y fibrosis del tejido intersticial, y asociando esto a lo reportado por Johnson y col. (1997) y Squires y col. (1999) quienes explican que la espermatogénesis es un proceso de división y diferenciación

en el cual los espermatozoides son producidos en los túbulos seminíferos, se entiende que cualquier afección a este nivel tiene incidencia en la fertilidad.

Por otra parte, Johnson y Neaves (1981), señala que los cambios en el parénquima testicular que están relacionados con la edad son la hiperplasia de las células de Leydig, hialinosis arterial, infiltración linfocitaria en el espacio peritubular y un aumento del colágeno y de las fibras elásticas en la lámina propia.

### **5.3.2 Sanidad:**

En el tracto reproductivo del macho es posible aislar un gran número de microorganismos, entre los que se cuentan *Streptococo beta hemolítico*, *Escherichia coli*, *Klebsiella genitalium*, *Pseudomona aeruginosa*, etc., cada uno de los cuales puede permanecer en el organismo sin producir ninguna alteración, o pudiendo exacerbarse por alguna razón y producir un cuadro clínico, tanto en el potro como en la yegua Rideout y col. (1982).

Love (1997) y Paccamonti (1999) afirman que la evaluación de la sanidad de un reproductor es una prueba importantísima en la determinación de su potencial reproductivo. En un estudio realizado por Neu y col. (1992) en que un grupo de potros fue inoculado con el virus de la arteritis viral equina, se observó una disminución tanto en el volumen del eyaculado como en la concentración espermática, la motilidad y la morfología, posiblemente por el aumento de la temperatura corporal y el edema escrotal. Smith (2001), asevera en relación a la sanidad, que la atrofia testicular también puede ser producida por tratamientos prolongados con antibióticos, lo que podría causar un daño temporal o permanente.

### **5.3.3. Raza:**

La raza es otro importante factor que hay que tener en consideración al momento de evaluar la fertilidad de un potro, ya que se ha visto que ésta tiene influencia en ciertas características como el volumen del eyaculado, la concentración y el porcentaje de espermatozoides móviles (Díaz, 1995 y Dowsett y Knott, 1996). De esta manera, Dowsett y Knott (1996) indican que la mayoría de las características seminales varían entre las distintas razas, a excepción del pH, color y anomalías de la pieza media, siendo las razas pequeñas las que producen el menor volumen total por eyaculado y el menor volumen libre de fracción gelatinosa con una alta concentración espermática. De esta manera, Paccamonti y col. (1999) señalan que las razas pequeñas tienen testículos más pequeños, y el número total de espermatozoides por eyaculado es menor que lo comúnmente aceptado para los padrillos de raza grande, por lo que habría que aplicar distintos criterios al momento de realizar un examen de fertilidad potencial para los potros de raza pequeña. Se debe tener en cuenta que esta diferencia es de tipo absoluto y no relativo en relación a la masa corporal.

Dowsett y Knott (1996) hacen notar que la raza no sólo influye directamente en las características seminales, ya que también tienen cierta influencia sobre las características conductuales de los padrillos. Así, en un estudio realizado con potros de 9 diferentes razas,

se observó que el número de servicios para lograr preñez varió entre las razas, siendo las razas pequeñas las que obtuvieron el mejor índice coital.

#### **5.3.4. Estación del año:**

Díaz y Arancibia (1971), Picket y col. (1975) y Janett y col. (2003), concuerdan que existen diferencias, en cuanto al volumen del eyaculado, en relación a los meses del año, y concluyen que hay una mayor producción de semen durante los meses que corresponden a la estación de monta. Por otra parte, Jasko y col. (1990) indican que hay variaciones significativas en las características seminales en relación a la estación del año, observándose una disminución de la fracción gelatinosa del eyaculado en los meses de invierno, así como también de la motilidad de los espermatozoides. Para Johnson y col. (1997) tanto la estación del año como la edad del animal, influyen notablemente en la producción diaria de espermatozoides. Los equinos se definen como una especie poliéstrica estacional de días largos, es decir que su actividad reproductiva va en directa relación con el fotoperíodo positivo, lo que claramente tendría efectos sobre la actividad del macho, siendo el período de receptividad al macho en las hembras de razas pequeñas más corto que en las yeguas de raza grande (Ginther, 1992).

Los objetivos de este trabajo son poder conocer las características andrológicas de los potros de raza Chilota durante la época no reproductiva con el fin de poder entregar antecedentes para estudios futuros en esta área.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### MATERIALES:

- 6 potros adultos de raza Chilota.
- 1 yegua de raza Chilota.
- 1 Vagina artificial, modelo Hannoveriano y sus implementos
- Mangas de palpación.
- 1 microscopio óptico
- 1 platina temperada.
- Material y equipo de laboratorio para la evaluación del semen.
- 1 equipo de ultrasonografía
- 1 huincha de medir
- Xilacina 2%
- Cipionato de estradiol ECP®.

### MÉTODOS:

#### 6.1. EXAMEN CLÍNICO GENERAL

El estudio fue realizado en el Haras “El señor de los caballos”, ubicado en la provincia de Puerto Montt, Décima región, durante los meses de Julio y Agosto del año 2002.

En la primera parte del estudio se realizó un examen clínico general de los potros, en el que se verificó la edad mediante los registros internos del haras, la actividad reproductiva durante la temporada anterior, esto es, el número de yeguas cubiertas durante la última temporada y el número de yeguas preñadas por cada potro. La condición corporal de los sementales se determinó mediante la observación y palpación de los depósitos grasos en el cuello, zona dorsal, y sacra, utilizando la escala dada por Meyer (1992), donde 1 es un animal emaciado y 5 un animal obeso, utilizando también los medios puntos.

#### 6.2. EVALUACIÓN DEL SEMEN

La segunda parte del estudio consistió en la realización de pruebas para conocer ciertas características, macro y microscópicas, del semen. Para poder recolectar las muestras se utilizó una yegua de la misma raza, la que fue estrogenizada mediante la utilización de cipionato de Estradiol (ECP®) en dosis de 2 mg. totales vía intramuscular. Al momento de la recolección, la yegua se inmovilizó por medio de trabas y maneas en sus extremidades para protección, tanto del potro como del personal presente. La cola de la

yegua fue vendada con el objeto de hacer más fácil la desviación del pene del potro para la introducción a la vagina artificial. Ésta se preparó con mangas plásticas para lograr una cámara de agua, la que se llenó con 2,5 litros aproximadamente y se mantuvo a 45° C, durante la preparación, para que al momento de la recolección la temperatura fuese de 42°C aproximadamente. El interior de la vagina artificial, y la zona por donde el pene era introducido, se lubricó con vaselina sólida.

Cada potro fue sometido a dos recolecciones de semen previas para remover el contenido epididimario almacenado por tiempo prolongado, para así obtener un eyaculado con espermatozoides de producción recientes, y luego se procedió a recolectar tres eyaculados, los que se obtuvieron día por medio para lograr un buen descanso entre recolección (Sullivan, 1978). Cada eyaculado fue analizado tanto macroscópicamente, con mediciones de volumen libre de gel, color, olor apariencia y pH, como microscópicamente, evaluando la motilidad progresiva, motilidad total, motilidad de masa, concentración espermática, intensidad de movimiento, tinción de vivos/muertos (Blom) y tinción de Karras para observar anomalías espermáticas.

La evaluación de la motilidad progresiva y la motilidad total se realizó colocando una gota de semen en un portaobjeto cubierto con un cubreobjeto, los que permanecían en una platina temperada a una temperatura de 37°C con la finalidad de mantener los espermatozoides móviles por más tiempo (Combes y col, 2000). Se realizó una estimación visual del porcentaje de células móviles presentes en el campo, y la prueba se repitió en tres campos para lograr un resultado más representativo, y así obtener un promedio de la motilidad progresiva.

La motilidad de masa fue evaluada inmediatamente después de la recolección, manteniéndose todos los elementos utilizados a una temperatura de 37° C en una platina temperada. Para observar el movimiento de masa se colocó una gota de semen en un portaobjeto sin cubreobjeto, y se observó con aumento de 32X.

La intensidad de movimiento se determinó junto con la evaluación de la motilidad progresiva, y se utilizó la escala descrita por Varner y Schumacher (1998), en la que 0 representa a las células espermáticas que se encuentran inmóviles, y 4 a las que se mueven en forma muy activa.

Para la determinación de la concentración espermática se utilizó una cámara de Neubauer, a una dilución de 1:100 y se realizó un conteo visual de las células presentes en cada cuadrante de la cámara en ambos lados, para luego obtener el promedio de los dos cálculos.

Para conocer el porcentaje de espermatozoides vivos se realizó la tinción de vivos/muertos (Blom), para la cual se hizo un frotis de semen, el que fue teñido con eosina y nigrosina y se mantuvo en la platina temperada hasta estar completamente seco. La lectura de los frotis se realizó en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal, y se observaron 200 células en cada eyaculado, en las que se determinó cuáles se encontraban muertas, ya que éstas se observaban con la cabeza teñida de color rosa por la alteración a nivel de la membrana permitiendo el ingreso de eosina al interior de la célula.

Para determinar la morfología de los espermatozoides se hizo un frotis de semen, el que se dejó secar a temperatura ambiente, para luego ser fijado en metanol, y luego de 24 horas se procedió a realizar la tinción, en que primero fue sumergido en una solución de amarillo de metacromo por 90 segundos, luego se lavó y se sumergió en una solución de tanino por 60 segundos, se volvió a lavar, y, por último, fue cubierto con una solución de azul de victoria por 15 segundos, se lavó por última vez y se dejó secar al aire libre. La lectura se realizó con un microscopio de contraste de fases, para lo cual se procedió a observar 200 células y determinar si éstas eran normales o presentaban alguna alteración, y si era así clasificarlas según la porción del espermatozoide que estuviese afectada.

### 6.3. MEDICIÓN DE LOS TESTÍCULOS

Finalizada las recolecciones, se continuó el estudio con la medición de los testículos. Se realizó mediciones para aproximar el volumen de éste mediante la fórmula descrita por Granville (1968). Se midió el largo cráneo-caudal, alto próximo-distal y ancho latero-medial de ambos testículos. A cada potrero, además, se le realizó palpación del parénquima con el fin de determinar la consistencia de éste. Estas mediciones se realizaron inmediatamente después de la evaluación de las GSA para lo cual los potros se encontraban sedados, como se describe en el siguiente punto.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$V = \frac{\pi * a * b * c}{6}$$

a: alto

b: ancho

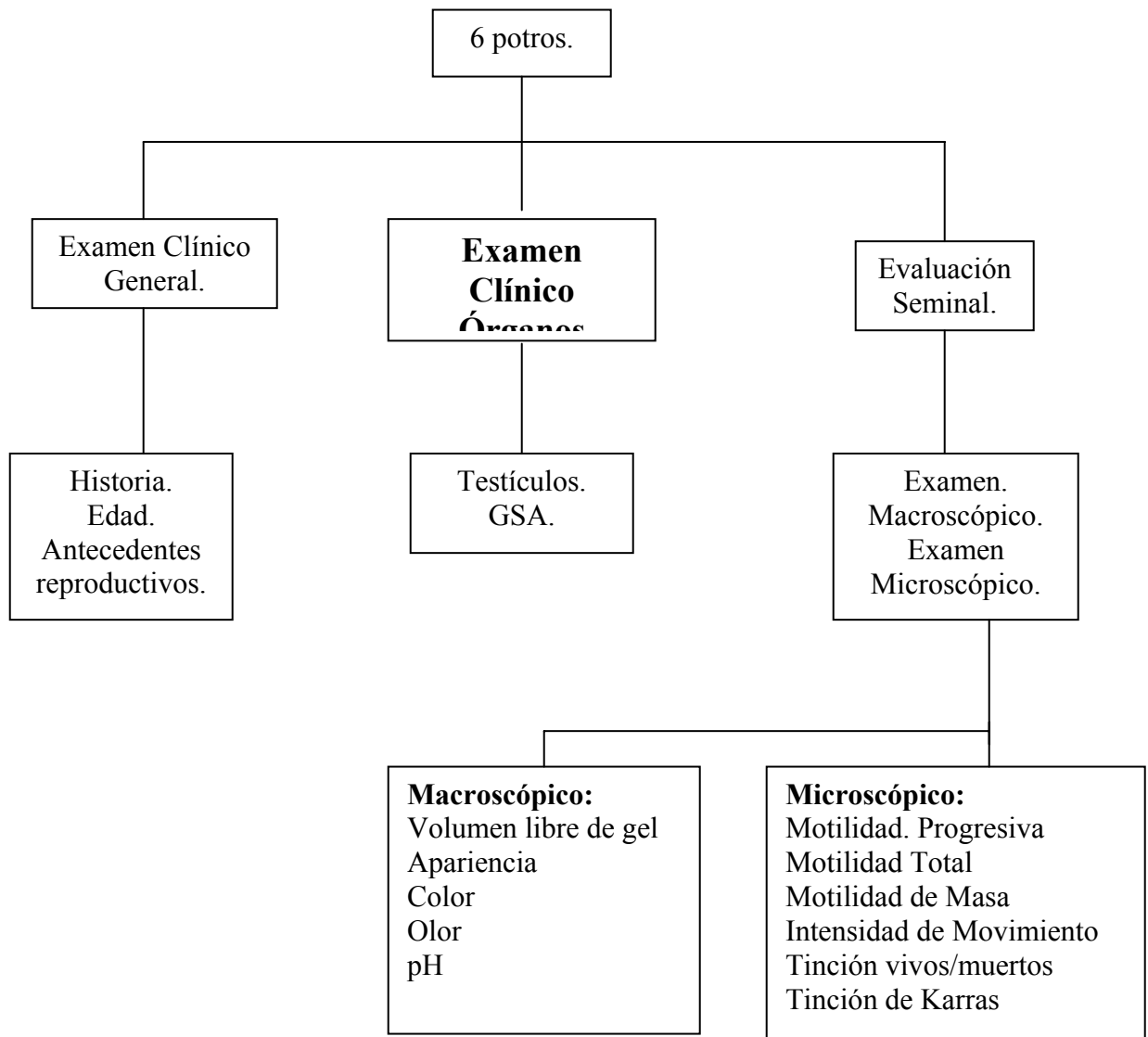
c: alto

### 6.4. EVALUACIÓN ULTRASONOGRÁFICA DE LAS GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS

Junto con las mediciones realizadas a los testículos de los potros se realizó el estudio ultrasonográfico de las glándulas sexuales accesorias para determinar su longitud y su ancho, por vía transrectal con un transductor de 5 MHz. Para la realización de este estudio los potros fueron sedados con Xilacina al 2% en dosis de 0.3 mg/Kg, para evitar riesgos tanto del personal involucrado como de los mismos potros. En ninguno de los potros se produjo eyaculación al ser sedados con Xilacina al 2%.



## 6.5. ESQUEMA DE TRABAJO



## 7. RESULTADOS

### 7.1. EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES

Los antecedentes reproductivos de la temporada anterior fueron obtenidos por medio de los registros internos del haras, en donde se constató que las yeguas cubiertas por los potros fueron preñadas en un 100% por medio de un sistema de monta natural. Estos antecedentes fueron obtenidos por medio de los registros internos del criadero (Tabla 1).

**Tabla 1.** Edad, condición corporal, número de yeguas cubiertas y preñadas en la temporada anterior.

<b>Nombre</b>	<b>Edad</b>	<b>C.C</b>	<b>Número de yeguas cubiertas y preñadas</b>
<b>Piñón</b>	7 años	3	4
<b>Barón</b>	6 años	2,5	3
<b>Germano</b>	5 años	3	7
<b>Palomo</b>	4 años	3	6
<b>Clinton</b>	6 años	3,5	3
<b>Tizón</b>	4 años	3	3

C.C.: Condición corporal.

### 7.2. EVALUACIÓN DEL SEMEN

#### 7.2.1. Características macroscópicas del semen

El promedio del volumen libre de gel fue de  $2.1 \pm 0.9$  ml. con un rango inferior de 1,2 ml. y un rango superior de 7 ml. El color y la apariencia variaron entre los potros, a diferencia del olor y el pH, los que se mantuvieron constantes en todos los eyaculados. De los 6 potros que constituyeron el estudio, 2 de ellos presentaron erección pero no montaron a la yegua, por lo que no se les pudo obtener semen disminuyendo el n de 6 a 4 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características macroscópicas promedio de los 3 eyaculados de cuatro potros Chilotes, obtenidos por medio de vagina artificial.

	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>Apariencia</b>	<b>pH</b>
<b>Piñón</b>	1,5	Bco-grisáceo	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Barón</b>	1,2	Bco-grisáceo	<i>sui generis</i>	acuoso	7
<b>Germano</b>	2,8	Bco-amarillento	<i>sui generis</i>	lechoso	7
<b>Palomo</b>	3,0	Grisáceo	<i>sui generis</i>	lechoso	7
<b>Promedio</b>	<b>2,1</b>				
<b>D.E.</b>	<b>0,9</b>				

D.E.: desviación estándar

### 7.2.2. Características microscópicas del semen

Las características microscópicas evaluadas pueden observarse en la tabla 3

**Tabla 3.** Características microscópicas del semen, obtenidos por vagina artificial, en donde se entrega el promedio de los 3 eyaculados de los cuatro potros.

	<b>M.P. (%)</b>	<b>M.T. (%).</b>	<b>C.E. (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>I.M. (0-4)</b>	<b>M.M. (1-4).</b>	<b>V/M (%)</b>	<b>% de células normales</b>
<b>Piñón</b>	63,3	76,6	418.333	4,0	1,0	74	59,4
<b>Barón</b>	51,6	63,3	223.000	2,3	1,0	61	63,7
<b>Germano</b>	61,6	73,3	712.000	3,3	1.3	68	56,7
<b>Palomo</b>	56,6	68,3	470.000	3,3	1,0	66	57,9
<b>Promedio</b>	<b>58,3</b>	<b>70,4</b>	<b>455.833</b>	<b>3,2</b>	<b>1,1</b>	<b>67,3</b>	<b>59,4</b>
<b>D.E</b>	<b>5,3</b>	<b>5,8</b>	<b>201196</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>5,4</b>	<b>3,1</b>

M.P.: motilidad progresiva; M.T.: motilidad total; C.E.: concentración espermática; I.M.: intensidad de movimiento; M.M.: motilidad de masa; V/M: % de células vivas en la tinción vivos/muertos; D.E.: desviación estándar.

### 7.3. TESTÍCULOS

Las medidas obtenidas de los testículos pueden observarse en la tabla 4.

**Tabla 4** Medidas testiculares de los potros en centímetros y volumen testicular expresado en centímetros cúbicos.

		<b>Piñón</b>	<b>Barón</b>	<b>Germano</b>	<b>Palomo</b>	<b>Clinton</b>	<b>Tizón</b>
<b>Testículo derecho</b>	<b>Largo (cm)</b>	6,5	7,0	7,5	6,0	8,0	7,5
	<b>Alto (cm)</b>	6,0	5,0	5,0	4,5	6,5	5,5
	<b>Ancho (cm)</b>	3,5	5,0	5,5	3,5	6,0	4,5
	<b>Volumen (cm<sup>3</sup>)</b>	71,5	91,6	107,9	49,5	163,3	97,1
<b>Testículo izquierdo</b>	<b>Largo (cm)</b>	7,0	7,0	8,0	6,0	7,5	8,0
	<b>Alto (cm)</b>	5,5	5,0	6,0	5,0	6,0	6,5
	<b>Ancho (cm)</b>	4,0	4,5	5,0	4,0	4,5	4,5
	<b>Volumen (cm<sup>3</sup>)</b>	80,6	82,4	125,6	62,8	106	122,5

La consistencia testicular fue igual para todos los potros, siendo ésta elástica, sin encontrar zonas de endurecimiento o de fibrosis a la palpación.

A continuación se entrega, en la tabla 5 los promedios y desviaciones estándar de las medidas testiculares.

**Tabla 5.** Tabla de promedios y desviaciones estándar de las medidas testiculares obtenidas en el estudio..

	<b>Testículo derecho</b>				<b>Testículo izquierdo</b>			
	<b>Largo (cm)</b>	<b>Alto (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>	<b>Volumen (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Alto (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>	<b>Volumen (cm<sup>3</sup>)</b>
<b>Promedio</b>	7,2	5,4	4,7	95,6	7,3	5,5	4,3	90,4
<b>D.E.</b>	0,8	0,7	1,0	38,6	0,8	1,0	0,7	25,3

**D.E.:** desviación estándar.

#### 7. 4. GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS

Las GSA evaluadas se observaron normales en los 6 potros examinados. A continuación se entregan los resultados obtenidos en las tablas 6, 7 y 8.

La próstata de los potros presentaba una aspecto lobulado, situándose alrededor del cuello de la vejiga. Fue posible observar poca cantidad de contenido dentro de estas glándulas en todos los potros.

**Tabla 6.** Resultados de las mediciones ecográficas realizadas a la próstata de los 6 potros, diferenciado cada uno de sus lóbulos.

	<b>Lóbulo derecho</b>		<b>Lóbulo izquierdo</b>	
	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>
<b>Piñón</b>	2,7	1,4	3,9	1,2
<b>Barón</b>	3,6	1,1	3,6	1,2.
<b>Germano</b>	2,8	1,8	2,9	1,5
<b>Palomo</b>	2,6	1,0	2,7	1,1.
<b>Clinton</b>	4,0	1,1	3,8	1,6
<b>Tizón</b>	3,0	1,5	3,7	1,4.
<b>Promedio</b>	<b>3,1</b>	<b>1,3</b>	<b>3,4</b>	<b>1,3.</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,2</b>

D.E.: desviación estándar

**Tabla 7.** Resultados de las mediciones ecográficas realizadas a las vesículas seminales de los 6 potros.

	<b>Derecha</b>		<b>Izquierda</b>	
	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>
<b>Piñón</b>	5,0	1,8	5,1	1,8
<b>Barón</b>	2,2	1,8	1,5	1,2
<b>Germano</b>	4,0	1,4	3,3	1,2
<b>Palomo</b>	3,7	1,1	3,4	1,1.
<b>Clinton</b>	3,7	1,2	4,5	0,9
<b>Tizón</b>	3,2	1,7	3,8	1,8
<b>Promedio</b>	<b>3,6</b>	<b>1,5</b>	<b>3,6</b>	<b>1,4</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,9</b>	<b>0,4</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>

D.E.: desviación estándar.

**Tabla 8.** Resultados de las mediciones realizadas a las glándulas bulbouretrales.

	<b>Derecha</b>		<b>Izquierda</b>	
	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>	<b>Largo (cm)</b>	<b>Ancho (cm)</b>
<b>Piñón</b>	2,5	1,2	3,2	1,1
<b>Barón</b>	5,2	1,1	5,3	1,5
<b>Germano</b>	2,6	1,3	2,5	1,5
<b>Palomo</b>	2,1	0,8	2,6	1,4
<b>Clinton</b>	2,1	1,0	2,1	1,1
<b>Tizón</b>	1,4	1,1	1,5	1,4
<b>Promedio</b>	<b>2,7</b>	<b>1,2</b>	<b>2,9</b>	<b>1,3</b>
<b>D.E.</b>	<b>1,3</b>	<b>0,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,3</b>

D.E.: desviación estándar.

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo información de diferentes características andrológicas de los potros de raza Chilota, las que son discutidas a continuación.

En relación a la edad, se observó que todos los potros evaluados pertenecían a un mismo grupo etario, entre 4 y 7 años, por lo que es posible agruparlos como reproductores jóvenes, y así evaluarlos con los mismos parámetros. Johnson y Neaves (1981), Dowsett y Knott (1996), Johnson y col. (1997), Davies (1999), Squires y col. (1999) y Fukuda y col. (2001). Por otra parte, su estado sanitario y condición nutricional, observados en el examen clínico estaban dentro de un estado de normalidad, estando la condición corporal entre los rangos de 2,5 y 3,5.

Las características macroscópicas del semen presentaron variaciones entre los potros, tanto en volumen como en color y apariencia. El volumen del eyaculado, en relación a otras razas equinas de mayor tamaño, es notoriamente inferior (2,13 ml en promedio), y aunque no se tiene información del volumen libre de gel de potros de raza grande en época no reproductiva, se sabe que el volumen del eyaculado en el período de actividad sexual varía entre un rango de 50 a 150 ml., concordando con los antecedentes entregados por Dowsett y Knott (1996) quienes señalan que los potros de raza de menor tamaño eyaculan volúmenes inferiores. Díaz y Arancibia (1971), Picket y col. (1975) y Janett y col. (2003), afirman que en los meses de menos horas luz hay una menor producción de semen en comparación a los meses de la estación reproductiva. De la misma manera, la cantidad de material gelatinoso, aportado por las vesículas seminales, fue inferior, como está descrito para esta especie en época no reproductiva. La apariencia del semen varió en los potros, obteniéndose que los eyaculados con semen de aspecto lechoso fueron los con mayor concentración de células espermáticas afirmando lo descrito por Jasko (1997).

En cuanto a las características microscópicas del semen, el promedio de la concentración espermática del semen fue mayor que la descrita para otras razas equinas, (siendo la concentración promedio obtenida de 455.833 células espermáticas por  $\text{mm}^3$ ), frente a la concentración en potros de otras razas la que alcanza las 210.000 células por  $\text{mm}^3$  como promedio), existiendo notorias diferencias entre los potros, con rangos que fluctuaron entre 208.000 y 831.000 espermatozoides/ $\text{mm}^3$ . En relación a la concentración espermática de otras razas de tamaño pequeño, los resultados obtenidos fueron similares en cuanto a la concentración de células espermáticas por ml. según los datos entregados por Paccamonti y col (1999), quienes afirman que los caballos de razas de menor tamaño tienen un semen de mayor concentración y de menor volumen. La motilidad total de los eyaculados varió entre los potros e incluso tuvo diferencias entre los tres distintos eyaculados de cada potro, observándose una alta correlación con la prueba de vivos/muertos, concordando con lo descrito por Casey y col. (1993).

La motilidad de masa sólo fue posible de evaluar en forma positiva en 1 eyaculado, siendo éste el de mayor concentración. La motilidad de masa es el producto resultante de la combinación de la concentración espermática y la motilidad individual, y como los equinos no se caracterizan por presentar un alto número de células espermáticas/mm<sup>3</sup>, ésta no es una característica que se evalúe en estos animales, pero dada la concentración espermática presentada por esta raza fue posible observarla en uno de los eyaculados, con un valor 1 en la escala de 0 a 4. Sobre la intensidad de movimiento no se tiene información para comparar resultados, pero sí se puede concluir que los eyaculados de más alta concentración presentaron una mayor intensidad de movimiento, lo que indicaría que existe una relación entre la producción de espermatozoides y la vitalidad de éstos, dicho de otra manera que hay una concordancia entre calidad y cantidad espermática. Hay que tener en cuenta, que estos potros no han sido sometidos a selección como reproductores por sus características fenotípicas ni deportivas, sino, sus cruzamientos han sido naturales de acuerdo a su fertilidad real.

Respecto al porcentaje de células anormales, se obtuvo valores relativamente altos, lo que estaría relacionado, posiblemente, a la época de recolección de las muestras, de acuerdo a lo descrito por Hurtgen y Johnson (1982). La fracción de la célula espermática que presentó mayor número de anomalías fue la cola (ver anexo 10), seguida del cuello. El número de células anormales pudiera estar relacionado, de acuerdo a lo descrito por Hurtgen y Johnson (1982), al descanso sexual prolongado, dado que en este caso, los potros se encontraban fuera del período de montas, y siendo el epidídimo el lugar de reservorio de espermatozoides pudiese contener células envejecidas si el potro no eyaculase en forma frecuente. Si bien a estos potros se les realizó 2 recolecciones para depletar las reservas espermáticas, puede haber sido insuficientes, ya que un gramo de parénquima testicular produce 10.000.000 de células espermáticas al día y si se tiene en cuenta que el par de testículos de un equino de raza pequeña pesan alrededor de 120 gramos, la producción total diaria sería de 1.200.000.000, por lo que la cantidad de espermatozoides contenidos en el epidídimo sería muy grande, pudiendo contener células en envejecimiento y envejecidas (Samper, 1997).

En relación a las medidas testiculares de los potros, se midió su largo cráneo-caudal, el alto próximo-distal y el ancho latero-medial. Las medidas obtenidas son levemente mayores a los datos entregados por Paccamonti (1999), donde el volumen promedio fue de 84 cm<sup>3</sup> para el testículo derecho y 81 cm.<sup>3</sup> para el izquierdo para los potros de raza pequeña, encontrándose en los límites inferiores del rango, pero por otra parte los testículos de mayor volumen fueron los que produjeron el semen de más alta concentración. No fue posible recolectar datos de las medidas testiculares de potros de razas pequeñas. En relación a lo descrito por Sisson y Grossman (1995) el testículo izquierdo fue levemente mayor que el derecho en 4 de los 6 potros (el 66,7% ), pero en cuanto al volumen promedio de los testículos, el testículo derecho fue 5,2 cm<sup>3</sup> (5,6%) menor que el izquierdo. En cuanto a la consistencia, en todos los potros fue firme y elástica como se describe normalmente para la especie, sin encontrar alguna alteración aparente a la palpación.

Los resultados de las mediciones de las GSA fueron similares con los datos entregados por Pozor y Mc Donnell (2002), quienes distinguen entre varias clases de caballos, según su tamaño, así se compararon los resultados con los del tipo *pony*, es decir



un caballo con un peso que varía entre 108 a 235 Kg , es decir el peso correspondiente a un caballo de raza Chilota. Los resultados obtenidos de las mediciones de las glándulas bulbouretrales reportadas por Pozor y Mac Donnell (2002) fueron de 2,8 cm. de largo y 1,7 cm. de ancho ( la de los potros Chilotes fue de largo 2,8 cm. y de ancho 1,4 cm. Los datos entregados de la próstata y las vesículas seminales fueron levemente mayores que los resultados obtenidos en los potros de raza Chilota, siendo el largo promedio de los lóbulos de la próstata de 4,1 cm. y el ancho de 2 cm, y el largo de las vesículas seminales fue de 1,9 cm. y el ancho de 1,8 cm.

De este trabajo podemos concluir que los potros de raza Chilota presentan un semen con una alta concentración espermática, la que es mayor a la mayoría de las otras razas equinas, posiblemente por la relación tamaño testicular/tamaño GSA, logrando un semen con características deseables para futuros estudios. Cabe destacar que al ser este un trabajo realizado fuera de la época de actividad reproductiva, es aconsejable la realización de este trabajo en la época de actividad reproductiva con el fin de conocer las posibles diferencias en relación a la estación del año.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- BEHN, C. 1991. Ecografía Transrectal de las Glándulas Sexuales del Potro. Tesis M.V. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- BRINSKO, S. P., G. S. VAN WAGNER, J. K. GRAHAM, E. L. SQUIRES. 2000. Motility, morphology, and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 56:111-120.
- CASEY, P. J., R. B. HILLMAN, K. R. ROBERTSON, A. I. JUDIN, I. K. LIU, E. Z. DROBNIS. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. Disponible en: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/abstract/14/4/289>.
- CASEY, P. J., C. G. GRAVANCE, R. O. DAVIS, D. D. CHABOT, I. K. M. LIU. 1996. Morphometric differences in sperm heads dimensions of fertile and subfertiles stallions. *Theriogenology*.47:575-582.
- COMBES, G. B., D. D. VARNER, F. SCHROEDER, R. C. BURGHARDT, T. L. BLANCHARD. 2000. Effect of cholesterol on motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fert.* 56:127-132.
- DAVIES, M. C. 1999. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. Ed. Cabi Publishing. Cambridge United Kingdom.
- DÍAZ, O. H. 1995. Reproducción, Crianza y Manejo en el caballo Fina Sangre de Carrera. Ed. Sigma. Santiago Chile.
- DIAZ, O. H., C. ARANCIBIA. 1971. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. s. e. Santiago Chile.
- DOWSETT, K. F., L. M. KNOTT. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46:397-412.
- DOWSETT, K. F., W. A. PATTIE. 1982. Characteristics and fertility of stallions semen. *J. Reprod fert.* 32:1-8.
- FUKUDA, T., M. KIKUCHI, T. KUROTAKI, T. OYAMADA, H. YOSHIKAWA, T. YOSHIKAWA. 2001. Age-related changes in the testes of horses. *Equine Vet. J.* 33:20-25.
- GINTHER, O. J. 1992. Reproductive biology of the mare. Segunda edición. Ed. Equiservices. Wisconsin, Estados Unidos.

- GRAHAM, J. K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. clinics of North America: Equine practice*. 12: 131-147.
- GRANVILLE, W. A., P. F. SMITH y W. R. LONGLEY. 1968. Cálculo diferencial e integral. s.e. México.
- HAFEZ, E. S. E. 1987. Reproduction in farms animals. Ed Lea & Febrier
- HELLEMANN, C., D. KRAUSE. 1982. Examen andrológico y manejo del semen. Curso para graduados. Valdivia, Chile.
- HESS, M. F., J. F. ROSER. 2001. The effect of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor 1 concentration in stallions. *Theriogenology*. 56:723-733.
- HURTGEN, J. P. en N. E ROBINSON,. 1983. Current therapy in equine medicine. Ed. W. B. Saunders. Philadelphia, Estados Unidos
- HURTGEN, J. P., L. A. JOHNSON. 1982. Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. *J. Reprod. Fert.* 32:15-20.
- JANETT, F., R THUN, K. NIEDERER, D. BURGER, M. HÄSSIG. 2003. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallions. *Theriogenology* 60:453-461.
- JASKO, D. J. 1997 en R. S. YOUNGQUIST. 1997. Current therapy in large animal theriogenology. Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, Estados Unidos
- JASKO, D. J., D. H. LEIN, R. H. FOOTE. 1990. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology* 35: 317-327.
- JOHNSON, L., T. L. BLANCHARD, D. D. VARNER, W. L. SCRUTCHFIELD. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*. 48:1199-1216.
- JOHNSON, L., W. B. NEAVES. 1981. Age-related changes in the Leydig cells population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biol Reprod*. 24:703-712.
- LYON, R. 2003. Pony Chilote. Disponible en: [www.ponychilote.cl](http://www.ponychilote.cl).
- LOVE, C. C. 1997. Examination of the Male Reproductive Tract: Evaluation of potential breeding soundness. En: R. S. YOUNGQUIST. Current therapy in Large Animal Theriogenology. Pp: 12-15. Ed. W. B. Saunders company. Philadelphia, Estados Unidos.
- LOVE, C. C., D. D. VARNER, J. A. THOMPSON. 2000. Intra-and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fert.* 56:93-100.

- MC DONNELL, S. 1983. Sexual behaviour Dysfunction in stallions. En N.E. ROBINSON. 1997. Current therapy in equine medicine. 668-3671. Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, Estados Unidos.
- MEYER, Kathrin. 1992. A study of the condition of working horses in Chile.. A dissertation submitted for the degree of Magister of scientia in world animal production. University College of North Wales United Kingdom.
- NEU, S. M., P. J. TIMONEY, S. R. LOWRY. 1992. Changes in semen quality in the stallion following experimental infection with equine arteritis virus. *Theriogenology*. 37: 407-429.
- PACCAMONTI, D. L., A. V. BUITEN, J. M. PARLEVLIT, B. COLENBRANDER. 1999. Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology*. 51: 1343-1349.
- PICKETT, B. W.; L. C. FAULKNER, J. L. VOSS. 1975. Effect of season on semen characteristics of stallion semen. *J. Reprod. Fert.* 23:25:28.
- POZOR, M. A., S. M. MC DONNELL. 2002. Ultrasonographic measurements of accessory sex glands, ampullae, and urethra of normal stallions of various size types. *Theriogenology*. 58:1425-1433.
- RIDEOUT, M. J., S. J. BURNS, R. B. SIMPSON. 1982. Influence of bacterial products on the motility of stallions spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 32:35-40.
- ROSSDALE, P. 1991. Cría y reproducción del caballo. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España.
- ROUSSET, H, P. H. CHANTELOUBE, M. MAGISTRINI, E. PALMER. 1987. Assesment of fertility and semen e of stallions. *J. Reprod. Fert.* 35:25-31.
- SAMPER, J. C. 1997. Techniques for artificial insemination. En: R. S. YOUNGQUIST. Current therapy in large animal theriogenology. Pp: 36-42 Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, Estados Unidos.
- SISSON, S., J. D. GROSSMAN. 1995. Anatomía de los animales domésticos. 5° edición. Ed. Salvat S.A. México D.F., México.
- SMITH, H. 2001. Infertility in stallions: evaluation of semen and sperm. Disponible en: <http://www.ctba.com/01magazine/dec01/HEATHERTHOMAS.pdf>.
- SULLIVAN, J. J. 1978. Characteristics and cryopreservation of stallion spermatozoa. *Cryobiology*. 15: 355-357.
- SULLIVAN, J. J. 1978. Characteristics and cryopreservation of stallion spermatozoa. *Cryobiology*. 15: 355-357.

- SQUIRES, E. L., B. W. PICKETT, J. K. GRAHAM, D. K. VANDERWALL, P. M. MC CUE, J. E. BRUEMMER. 1999. Cooled and frozen stallion semen. Animal reproduction and biotechnology laboratory. s.e. Colorado State University, Estados Unidos.
- THOMPSON, D. L., B. W. PICKETT, E. L. SQUIRES, T. M. NETT. 1980. Sexual behavior, seminal pH and accessory sex glands weight in gelding administered testosterone and (or) estradiol 17a. *J. Animal Sci.* 51: 1358-1366.
- VARNER, D. 1983. Handling of stallion semen. En: N.E. ROBINSON. Current therapy in equine medicine. Pp: 674-677. Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, EE.UU.
- VARNER, D. D., J. SCHUMACHER 1998. Enfermedades del aparato reproductivo: el padrillo. En: C. COLAHAN. Pp: 773-860. Medicina y Cirugía Equina. 4ª edición. Ed. Intermédica. Colombia.
- WEBWER, J. A., G. L. WOODS.1983. Ultrasonographic evaluation of accessory sex gland structure and function in the stallion. En: N.E. ROBINSON. Current therapy in equine medicine. Pp:678-681. Ed. W. B. Saunders Company. Philadelphia, EE.UU.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Características macroscópicas del primer eyaculado.

	<b>Volumen s/gel (ml)</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>Apriencia</b>	<b>pH</b>
<b>Piñón</b>	2,5	Bco-amarillento	Sui generis	lechoso	7
<b>Barón</b>	2	Bco-grisáceo	Sui generis	acuoso	7
<b>Germano</b>	5	Amarillento	Sui generis	lechoso	7
<b>Palomo</b>	3	Grisáceo	Sui generis	lechoso	7
<b>Promedio</b>	<b>3,1</b>				
<b>D.E.</b>	<b>1,31</b>				

D.E.: Desviación estándar.

**Anexo 2.** Características microscópicas del primer eyaculado.

	<b>M. P %</b>	<b>M.T. %</b>	<b>C.E. /mm<sup>3</sup></b>	<b>I. M.</b>	<b>M.M.</b>	<b>V/M %</b>
<b>Piñón</b>	70	80	530.000	4	0	80
<b>Barón</b>	50	60	224.000	2	0	65
<b>Germano</b>	60	80	831.000	3	1	70
<b>Palomo</b>	60	70	440.000	3	0	65
<b>Promedio</b>	<b>60</b>	<b>72,5</b>	<b>506.250</b>	<b>3</b>	<b>0,25</b>	<b>70</b>
<b>D.E.</b>	<b>8,2</b>	<b>9,6</b>	<b>251714,6</b>	<b>0,82</b>	<b>0,5</b>	<b>7,1</b>

M.P.: motilidad progresiva; M.T.: motilidad total; C.E.: concentración espermática; I.M.: intensidad de movimiento; M.M.: motilidad de masa; V/M: % de células vivas en la tinción vivos/muertos; D.E.: desviación estándar.

**Anexo 3.** Principales anomalías en el primer eyaculado.

	<b>Acrosoma</b>	<b>Cabeza</b>	<b>Cuello</b>	<b>Tracto intermedio</b>	<b>Cola</b>	<b>% de células anormales</b>
<b>Piñón</b>	15	18	20	24	17	47
<b>Barón</b>	4	16	10	23	25	39
<b>Germano</b>	5	13	55	7	20	50
<b>Palomo</b>	2	12	15	10	65	52
<b>Promedio</b>	<b>6,5</b>	<b>14,75</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>31,75</b>	<b>47</b>
<b>D.E.</b>	<b>5,8</b>	<b>2,8</b>	<b>20,4</b>	<b>8,8</b>	<b>22,4</b>	<b>5,7</b>

D.E.: desviación estándar

**Anexo 4.** Características macroscópicas del segundo eyaculado.

	<b>Volumen s/gel (ml)</b>	<b>Color</b>	<b>Olor</b>	<b>Apriencia</b>	<b>pH</b>
<b>Piñon</b>	1,5	Bco-grisáceo	<i>sui-generis</i>	acuoso	7
<b>Barón</b>	1,2	Grisáceo	<i>sui-generis</i>	acuoso	7
<b>Germano</b>	2,8	Blanquecino	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Palomo</b>	3	Grisáceo	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Promedio</b>	<b>2,1</b>				
<b>D.E.</b>	<b>0,907</b>				

D.E.: desviación estándar.

**Anexo 5.** Características microscópicas evaluadas en el segundo eyaculado.

	<b>M.P. %</b>	<b>M.T %.</b>	<b>C.E. /mm<sup>3</sup></b>	<b>I.M.</b>	<b>M.M.</b>	<b>V/M %</b>
<b>Piñon</b>	60	70	261.000	4	0	67
<b>Barón</b>	55	60	208.000	2	0	58
<b>Germano</b>	60	70	658.000	3	0	66
<b>Palomo</b>	60	70	542.000	4	0	68
<b>Promedio</b>	<b>59</b>	<b>68</b>	<b>417.250</b>	<b>3,25</b>	<b>0</b>	<b>65</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>217349,8</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>

M.P.: motilidad progresiva; M.T.: motilidad total; C.E.: concentración espermática; I.M.: intensidad de movimiento; M.M.: motilidad de masa; V/M: % de células vivas en la tinción vivos/muertos; D.E.: desviación estándar.

**Anexo 6.** Evaluación de las anomalías espermáticas presentes en el segundo eyaculado de acuerdo a la porción afectada.

	<b>Acrosoma</b>	<b>Cabeza</b>	<b>Cuello</b>	<b>Tracto intermedio</b>	<b>Cola</b>	<b>% de células anormales</b>
<b>Piñon</b>	7	24	18	14	18	40,5
<b>Barón</b>	3	12	15	18	25	36,5
<b>Germano</b>	7	15	42	9	22	47,5
<b>Palomo</b>	6	10	17	8	38	39,5
<b>Promedio</b>	<b>5,75</b>	<b>15,25</b>	<b>23</b>	<b>12,25</b>	<b>25,75</b>	<b>41</b>
<b>D.E.</b>	<b>1,9</b>	<b>6,2</b>	<b>12,8</b>	<b>4,7</b>	<b>8,7</b>	<b>4,7</b>

D.E.: desviación estándar

**Anexo 7.** Características macroscópicas del tercer eyaculado.

	Volumen s/gel (ml)	Color	Olor	Apriencia	pH
<b>Piñón</b>	7	Bco-grisáceo	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Barón</b>	1	Bco-amarillento	<i>sui-generis</i>	acuoso	7
<b>Germano</b>	2	Blanquecino	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Palomo</b>	2,8ml	Grisáceo	<i>sui-generis</i>	lechoso	7
<b>Promedio</b>	<b>3,21</b>				
<b>D.E.</b>	<b>2,63</b>				

**Anexo 8.** Características microscópicas evaluadas en le tercer eyaculado.

	M.P (%)	M.T. (%)	C.E. /mm <sup>3</sup>	I.M.	M.M.	V/M (%)
<b>Piñón</b>	60	80	464.000	4	0	75
<b>Barón</b>	50	60	237.000	3	0	60
<b>Germano</b>	65	75	647.000	4	0	73
<b>Palomo</b>	50	65	428.000	3	0	60
<b>Promedio</b>	<b>56</b>	<b>70</b>	<b>440.000</b>	<b>3,5</b>	<b>0</b>	<b>67</b>
<b>D.E.</b>	<b>0,08</b>	<b>0,1</b>	<b>188041</b>	<b>0,57</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>

M.P.: motilidad progresiva; M.T.: motilidad total, C.E.: concentración espermática; I.M.: intensidad de movimiento, M.M.: motilidad de masa, V/M: % de células vivas en la tinción vivos/muertos; D.E.: desviación estándar.

**Anexo 9.** Principales anomalías presentes en el tercer eyaculado según porción afectada.

	Acrosoma	Cabeza	Cuello	Tracto intermedio	Cola	% de células anormales
<b>Piñón</b>	5	18	13	17	15	34%
<b>Barón</b>	6	15	12	14	20	33,5%
<b>Germano</b>	4	16	19	15	21	33,5%
<b>Palomo</b>	3	15	12	22	18	35%
<b>PROMEDIO</b>	<b>4,5</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18,5</b>	<b>34%</b>
<b>D.E.</b>	<b>1,29</b>	<b>1,41</b>	<b>3,37</b>	<b>3,56</b>	<b>2,65</b>	<b>0,007</b>

D.E.: desviación estándar