



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO* DE LA CALIDAD DE SEMEN
EQUINO CRIO-CONSERVADO Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE
DISPERSIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

PRESENTA

LETICIA JACQUELINE PÉREZ TOLEDANO GUERRERO

TUTOR: DR. SALVADOR ROMO GARCÍA. FMVZ

COMITÉ TUTORAL:

DR. JESÚS GUEVARA GONZÁLEZ FES-CUAUTITLÁN

DR. MICHAEL E. KJELLAND

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

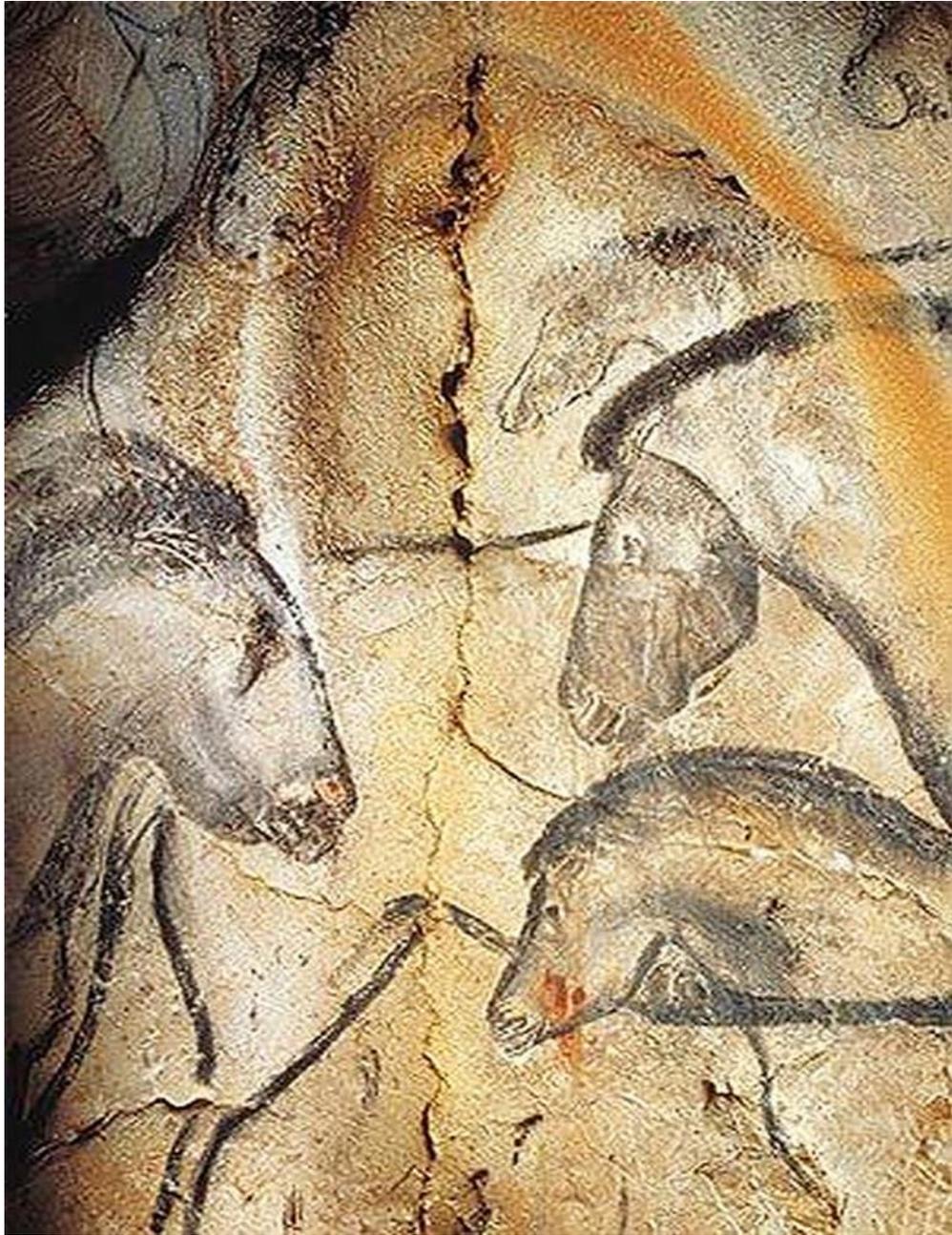


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Lascaux

At:

Dr Carlos Guerrero Villarreal

Dr José Manuel Pérez Toledano J.

RECONOCIMIENTOS: *El presente trabajo de investigación se realizó con la colaboración de:*

La UNAM

El CONACYT

Mis tutores:

Dr. Salvador Romo García. FES Cuautitlán UNAM

Dr. Jesús Guevara González. FES Cuautitlán UNAM

Dr. Michael E. Kjelland. Research Biologist, Conservation , Genetics & Biotech, LLC, Vicksburg, MS.

Mis asesores:

Dra. Adelfa D.C. García Contreras. UAM Xochimilco y su equipo

M en C. Lyda Y. Parra Forero. UAM Xochimilco

MVZ Antonio Jersain Montiel Quiroga UNAM y MVZ Mónica Isabel Montiel Garza UNAM

Dra. Alma Virginia Lara Sagahon FES Cuautitlán UNAM

Dr. A. Enrique Esperón Sumano FES Cuautitlán UNAM

M en C Ana Delia Rodríguez Cortez UNAM

Y también la colaboración del:

MVZ Rafael Pérez González FES Cuautitlán UNAM

Las instituciones que participaron en la parte experimental:

- Unidad Médico Veterinaria de la UPM, Montada, SSP, CDMX.

Con el apoyo del:

MVZ Manuel E. Morones Soto, UNAM y su equipo

- Policía Montada de Cuautitlán Izcalli, Estado de México

Con el apoyo del:

MVZ Fidel Moreno Pérez, FES Cuautitlán UNAM

MVZ Dipl. Cecilia Barragán Segura. FES Cuautitlán UNAM

- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas Cd. Victoria Tamaulipas

Con el apoyo del:

MVZ. Rigoberto López Zavala. Director de la FMVZ-UAT

MVZ Carlos Milton Rodríguez Rodríguez. FMVZ-UAT y sus alumnos.

MVZ Carlos Alberto Garza Pacheco. FMVZ-UAT

MVZ Manuel Antonio Goldaracena Olvera FMVZ-UAT

MVZ Edgar Alberto López Acevedo FMVZ-UAT

Laboratorio Alfonso Marx S.A. de C.V.

Con el apoyo de:

Ma Alejandra Cruz Peinado

Las instituciones que me recibieron durante mi estancia en España y Francia:

- Universidad Autónoma de Barcelona

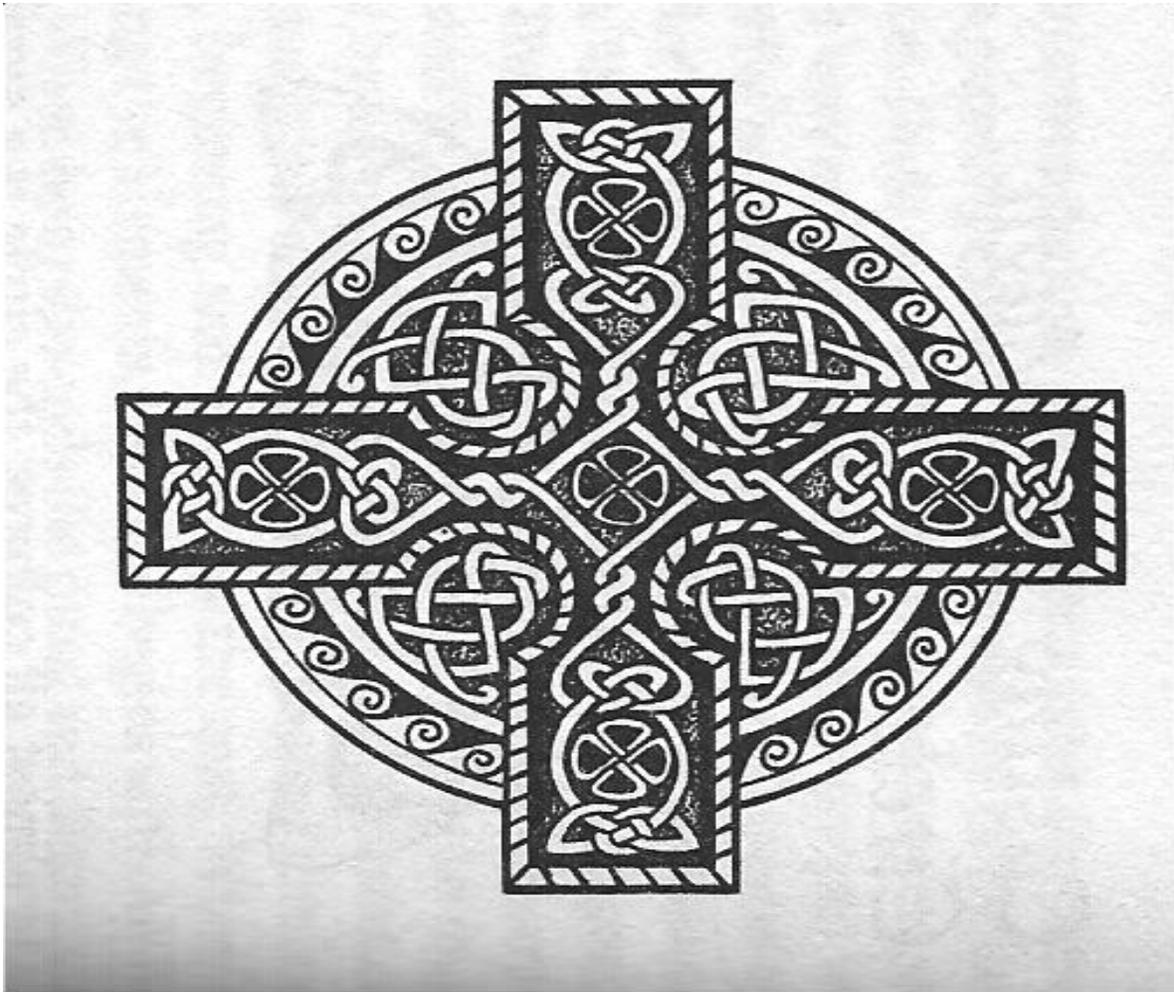
Con el apoyo del

Dr Jordi Miró i Roig. Director del servicio de Reproducción Equina

- Haras de Talma, Clinique Vétérinaire des Termes, Grandprés, Francia

Con el apoyo del

Dr Michel Guiot y la Dra Joëlle Vanbraban



*A cada uno de ustedes les agradezco infinitamente
por haber compartido conmigo sus conocimientos.*

***“NAÎTRE, MOURIR, RENÂÎTRE ENCORE
ET PROGRESSER SANS CESSÉ
TELLE EST LA LOI”***

Hippolyte L. Denizard Rivail

ÍNDICE

I ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XI
II RESUMEN	1
III INTRODUCCIÓN	3
IV JUSTIFICACIÓN	3
V HIPÓTESIS	3
VI OBJETIVOS	4
1.- OBJETIVO GENERAL	4
2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
VII ANTECEDENTES GENERALES	4
A) ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR EQUINO	4
1.- LOS TESTÍCULOS	4
2.- EL EPIDÍDIMO.....	5
2.1.- Generalidades del epidídimo.....	6
2.2.- Funciones del epidídimo	6
2.3.- El líquido epididimario	6
2.4.- Las células del epitelio epididimario	6
2.5.- Modificaciones que sufre el espermatozoide durante su paso por el epidídimo.....	8
2.6.- La condensación de la cromatina.....	8
2.7.- Regulación del volumen del espermatozoide	8
2.8.- Modificaciones del acrosoma durante su paso en el epidídimo	10
2.9.- Modificaciones de las proteínas en el epidídimo	10
2.10.- Proteínas que intervienen en la motilidad espermática en el epidídimo ...	11
2.11.- Protección antioxidante durante el tránsito del espermatozoide en el epidídimo.....	12
3.- EL CONDUCTO DEFERENTE	13
4.- LA URETRA.....	13

5.- LAS GLÁNDULAS ANEXAS	13
5.1.- Las vesículas seminales	13
5.2.- La próstata	13
5.3.- Las glándulas de Cowper o glándulas bulbouretrales	14

B) EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DEL SEMENTAL 14

1.- EL MECANISMO DE ERECCIÓN	14
2.- EL SEMEN EQUINO	14
3.- LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SEMEN	15
4.- LA FORMACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES	15
4.1.- La espermatogénesis	15
4.2.- La espermiogénesis	17
5.- FACTORES QUE ALTERAN LA FORMACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES	19
6.- ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE.....	19
6.1.- El espermatozoide equino.....	21
6.2.- Capacitación del espermatozoide	21
6.3.- Morfología del espermatozoide equino	22
6.4.- Motilidad del espermatozoide.....	28
7.- ALGUNAS ANOMALÍAS REPRODUCTIVAS QUE AFECTAN LA FERTILIDAD EN EL EQUINO	28

VIII ORÍGENES DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.....29

A) LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO 29

**B) FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA FUNCIONALIDAD DE LOS
 ESPERMATOZOIDES EQUINOS..... 32**

1.- ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	34
1.1.- Fosforilación de la tirosina.....	34
1.2.- Remoción del Colesterol durante la capacitación	34
1.3.- Sincronizando la conducción de la óxido reducción (REDOX) para la capacitación	34
2.- EL ESTRÉS OXIDANTE EN LA CRIOPRESERVACIÓN	35

**B) AFECTACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES EQUINOS
 POR EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES
 REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y POR EL ESTRÉS OXIDANTE 36**

1.-AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN EL SEMEN EQUINO	36
1.1.- Producción excesiva de ROS por los espermatozoides anormales e inmaduros	36
1.2.- Producción excesiva de ROS por los espermatozoides, por actividad mitocondrial aberrante y una riqueza inhabitual en ácidos grasos poli-insaturados	39
1.3.- Producción excesiva de ROS por los leucocitos que contaminan el semen	39
2.- EFECTOS NEGATIVOS DEL ESTRÉS OXIDANTE EN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL	40
3.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA OXIDACIÓN DEL ADN	41
3.1.- Factores implicados en la etiología del estrés oxidante.....	43
4.- IMPLICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL PROCESO DE APOPTOSIS.....	43
5.- PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA Y NO ENZIMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDEOS EQUINOS CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	45
6.- FALTA DE INTEGRIDAD DEL GENOMA ESPERMÁTICO	45
6.1.- La capacidad fecundante del espermatozoide con fragmentación de ADN	46
IX EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO	47
X RECOLECCIÓN DE SEMEN EQUINO	52
1.- MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE SEMEN	52
2.- PREPARACIÓN PARA LA RECOLECCIÓN DEL SEMEN.....	56
3.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL SEMEN EQUINO COLECTADO.....	59
4.- TRATAMIENTO DEL SEMEN PREVIO A SU CONSERVACIÓN.....	70
5.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN.....	71
6.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EQUINOS	75
XI ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL A TRAVÉS DEL SEMEN EQUINO EN LAS INSEMINACIONES ARTIFICIALES.....	77
1.- VIRALES.....	77
2.- BACTERIANAS.....	78
3.- PROTOZOARIAS	79

4.-OTRAS INFECCIONES QUE SE TRANSMITEN A TRAVÉS DEL SEMEN	80
XII.- LEGISLACIÓN SOBRE EL MANEJO DE SEMEN EQUINO.....	81
XIII MATERIAL Y MÉTODOS.....	84
XIV RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CONVENCIONALES Y AVANZADAS	91
A) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIANZA (ANOVA) CON EL PAQUETE RCOMMANDER	96
1.- MOTILIDAD	96
1.1.- Motilidad por caballo según el tiempo y la dilución	96
1.2.- Motilidad según el tiempo y la dilución de los caballos de la UPM y de la UAT	97
1.3.- Motilidad del grupo UPM/UAT	98
1.3.1.- Motilidad por caballo del grupo UPM/UAT	98
1.3.2.- Motilidad según el tiempo y la dilución del grupo UPM/UAT	99
1.4.- Motilidad de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	100
1.4.1.- Motilidad por caballo de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	100
1.4.2.- Motilidad de los caballos jóvenes por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT	101
1.5.- Motilidad de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	102
1.5.1.- Motilidad por caballo de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	102
1.5.2.- Motilidad de los caballos viejos por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT	103
2.- VIABILIDAD	104
2.1- Viabilidad por caballo según el tiempo y la dilución.....	104
2.2.- Viabilidad según el tiempo y la dilución de los caballos de la UPM y de la UAT	105
2.3.- Viabilidad del grupo UPM/UAT.....	106
2.3.1.- Viabilidad por caballo del grupo UPM/UAT	106
2.3.2.- Viabilidad según el tiempo y la dilución del grupo UPM/UAT	107
2.4.- Viabilidad de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	108
2.4.1.- Viabilidad por caballo de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	108
2.4.2.- Viabilidad caballos jóvenes por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT	109
2.5.- Viabilidad de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	110

2.5.1.- Viabilidad por caballo de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	110
2.5.2.- Viabilidad caballos viejos por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT ..	111
3.- REACCIÓN ACROSOMAL	112
3.1.- Reacción acrosomal por caballo según el tiempo y la dilución.....	112
3.2.- Reacción acrosomal según el tiempo y la dilución de los caballos de la UPM y de la UAT	113
3.3.- Reacción acrosomal del grupo UPM/UAT	114
3.3.1.- Reacción acrosomal por caballo del grupo UPM/UAT	114
3.3.2.- Reacción acrosomal según el tiempo y la dilución del grupo UPM/UAT	115
3.4.- Reacción acrosomal de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.....	116
3.4.1.- Reacción acrosomal por caballo de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	116
3.4.2.- Reacción acrosomal de los caballos jóvenes por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT	117
3.5.- Reacción acrosomal de los caballos viejos del grupo UPM/UAT.....	118
3.5.1.- Reacción acrosomal por caballo de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	118
3.5.2.- Reacción acrosomal de los caballos viejos por tiempo y dilución del grupo UPM/UAT	119
4.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	120
4.1- Fragmentación del ADN espermático en porcentaje por caballo	120
4.2.- Fragmentación del ADN espermático en porcentaje de los caballos de la UPM y de la UAT	122
4.2.1.- Comparación de la fragmentación del ADN espermático en porcentaje de los caballos de la UPM y de la UAT	123
4.2.2.- Comparación de la fragmentación del ADN espermático en porcentaje de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	123
4.2.3.- Comparación de la fragmentación del ADN espermático en porcentaje de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	124
5.- DATOS DE MOTILIDAD, VIABILIDAD Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN	124
5.1.- Comparación de los resultados de motilidad y viabilidad con los de fragmentación del ADN por caballo	124
5.2.- Comparación de los resultados de motilidad y viabilidad con los de fragmentación de los caballos de la UPM y de los caballos de la UAT.....	126
5.3.- Parámetros de motilidad, de viabilidad, comparados con el de fragmentación del ADN en porcentaje por tiempo y por caballo	127

5.4.- Parámetros de motilidad, de viabilidad, comparados con el de fragmentación del ADN en porcentaje por tiempo de los caballos de la UPM y de los caballos de la UAT	133
5.5.- Parámetros de motilidad, de viabilidad, comparados con el de fragmentación del ADN en porcentaje por tiempo de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	135
5.6.- Parámetros de motilidad, de viabilidad, comparados con el de fragmentación del ADN en porcentaje por tiempo de los caballos viejos del grupo UPM/UAT	136
B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE SUPERVIVENCIA CON EL MÉTODO DE KAPLAN MEIER	137
1.- CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD. DE MÉXICO (UPM)	137
1.1.- Monta nº1 UPM.....	137
1.2.- Monta nº2 UPM	138
1.3.- Monta nº3 UPM.....	139
1.4.- Monta nº4 UPM.....	140
2.- CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT).....	141
2.1.- Monta nº1 UAT	141
2.2.- Monta nº2 UAT	142
2.3.- Monta nº3 UAT	143
2.4.- Monta nº4 UAT	144
3.- COMPARACIÓN ENTRE LOS CABALLOS DE LA UPM Y LOS CABALLOS DE LA UAT	145
3.1.- Monta nº1 UPM/UAT	145
3.2.- Monta nº2 UPM/UAT.....	145
3.3.- Monta nº3 UPM/UAT	146
3.4.- Monta nº4 UPM/UAT	146
4.- CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT.....	147
4.1.- Monta nº1. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	147
4.2.- Monta nº2. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	148
4.3.- Monta nº3. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	149
4.4.- Monta nº4. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	150

5.- CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT	151
5.1.- Monta nº1. Caballos viejos del grupo UPM/UAT	151
5.2.- Monta nº2. Caballos viejos del grupo UPM/UAT	151
5.3.- Monta nº3. Caballos viejos del grupo UPM/UAT	152
5.4.- Monta nº4. Caballos viejos del grupo UPM/UAT	152
6.- TODOS LOS CABALLOS DEL GRUPO UPM/UAT	153
6.1.- Monta nº1. De todos los caballos del grupo UPM/UAT	153
6.2.- Monta nº2. De todos los caballos del grupo UPM/UAT	154
6.3.- Monta nº3. De todos los caballos del grupo UPM/UAT	155
6.4.- Monta nº4. De todos los caballos del grupo UPM/UAT	156
C) REGISTROS GRÁFICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS SEIS SEMENTALES CON O SIN DISPERSIÓN DE LA CROMATINA	157
1.- CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD. DE MÉXICO (UPM)	157
2.- CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT).....	158
XV DISCUSIÓN	160
XVI CONCLUSIONES	162
XVII BIBLIOGRAFÍA	164
XVIII ANEXO	181
A) DATOS DE LOS CABALLOS DEL GRUPO UPM/UAT	181
1.- Caballo nº1	181
2.- Caballo nº2	181
3.- Caballo nº3	181
4.- Caballo nº4	182
5.- Caballo nº5	182
6.- Caballo nº6	183
7.- Promedio de los tres caballos de la Policía Montada de la Cd de México (UPM)	183
8.- Promedio de los tres caballos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT).....	183

9.- Medias y desviación estándar del grupo de la Policía Montada de la Cd de México/Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UPM/UAT)	183
10.- Medias y desviación estándar de los seis caballos del grupo de la Policía Montada de la Cd de México/Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UPM/UAT)	186
2.- ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CON EL MÉTODO DE KAPLAN MEIER	187
1.- Caballos de la Policía Montada de la Cd. de México (UPM)	187
2.- Caballos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT)	189
3.- Comparación entre los caballos de la UPM y los caballos de la UAT	190
4.- Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT	193
5.- Caballos viejos del grupo UPM/UAT	195
6.- Todos los caballos del grupo UPM/UAT	197

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG.1.- Esquema del testículo y del epidídimo	5
FIG.2.- Representaciones de los diferentes tipos celulares epididimarios de los mamíferos	7
FIG.3.- Representación de la migración de la gota citoplasmática a lo largo del espermatozoide durante su paso por el testículo y el epidídimo	9
FIG.4.- Principales proteínas epididimarias secretadas en tres especies, expresadas en porcentaje según su secreción total	11
FIG.5.- La espermatogénesis por Nicole Vacheret (1).....	16
FIG.6.- La espermatogénesis por Nicole Vacheret (2).....	17
FIG.7.- Formación del acrosoma durante la espermiogénesis	18
FIG.8.- Estructura del espermatozoide por Mariana Ruiz (1).....	20
FIG.9.- Estructura del espermatozoide por Mariana Ruiz. (2).....	20
FIG.10.- Espermátide o espermatozide	21
FIG.11.- Capacitación del espermatozoide	21
FIG.12.- Clasificación morfológica de la cabeza: Defectos de conformación de la cabeza	22
FIG.13.- Clasificación morfológica de la cabeza: Defectos del acrosoma.....	23
FIG.14.- Morfología de la cola (1).....	24
FIG.15.- Morfología de la cola (2).....	25
FIG.16.- Duplicación de cabezas y de colas	26
FIG.17.- Cabezas sueltas.....	27
FIG.18.- Membranas intactas	27
FIG.19.- Trayectorias del espermatozoide equino	28
FIG.20.- Principales vías oxidantes celulares y sistemas antioxidantes que transforman o inactivan a las especies reactivas de oxígeno	31
FIG.21.- Estrés oxidativo.....	33

FIG.22.- Mecanismos de la producción excesiva de las especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides humanos, presentando una retención del citoplasma	37
FIG.23.- Morfología normal y anormal de los espermatozoides asociada al aumento de la producción de los ROS	38
FIG.24.- Hipótesis del daño oxidante del ADN en los espermatozoides humanos	42
FIG.25.- Presentación de las principales acciones fisiológicas y patológicas de las especies reactivas de oxígeno en los espermatozoides	44
FIG 26.- Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el DNA de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina	51
FIG.27.- Tabla de valores seminales en equinos varios autores	62
FIG.28.- Espematozoide equino normal no fragmentado (LJPTG).....	66
FIG.29.- Espermatozoides equinos fragmentados (LJPTG)	67
FIG.30.- Espermatozoide equino degradado (LJPTG)	67
FIG.31.- Tabla de la curva de enfriamiento del Equitainer (LJPTG)	74

ABREVIATURAS

- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ANOVA: Análisis de varianza
- ARN : Ácido ribonucleico
- ARNm : Ácido ribonucleico mensajero
- ATP : Adenosina trifosfato
- BODIPY C11 : C11-BODIPY 581/591: 4,4 Difluoro-5-(4-phenyl-1,3 butadienyl)-4-bora-3^a,4^a-diazas-indacene-3-undecanoico ácido
- cAMP : Adenosín monofosfato cíclico
- CASA : Análisis de semen asistido por computador
- CAT : Catalasa
- CLO* : Radical Hipoclorito
- CO₂ : dióxido de carbono
- DPI : Flavoproteína inhibidor difenileno
- FSH :Hormona folículo-estimulante
- GSH : Glutación reducida
- GPX : Glutación peroxidasa
- 4-HNE : 4 hidroxil-2-nonenal
- HO* : Radical hidroxilo
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- LH : Hormona luteinizante
- LPO : Peroxidación de los lípidos
- MPO : Mieloperoxidasa
- NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- NO : Monóxido de nitrógeno
- NOS : NO sintasa
- NOX : NADPH oxidasa
- O₂⁻ : Anión superóxido
- 8-OH-dG : 8-hidroxil-2 'desoxiguanosina

- OGG1 : Oxoguanina glicosilasa
- ONOO* : Radical peroxinitrito
- ONOOH : Nitro-peróxido
- REDOX: Oxido reducción
- RO* : Radical Alcohoxilos
- ROO* : Radical Peroxilo
- ROOR* : Radical Peróxidos
- ROS : Especies reactivas de oxígeno
- SCD : Prueba de la dispersión espermática
- SCSA : Citometría de flujo de la cromatina espermática
- SOD : Superóxido dismutasa
- TUNEL : TdT- mediated dUtp Nick End Labelling
- X-XO : Xantina- xantina oxidasa

II RESUMEN

El uso de semen enfriado y conservado a **5°C** en refrigeración se ha convertido en un método de rutina en la industria equina para la inseminación de yeguas. Este procedimiento proporciona una forma segura y menos costosa para su reproducción, ya que evita los riesgos asociados con el transporte de los sementales al lugar donde se encuentran las yeguas. El semen almacenado a **5°C** durante aproximadamente 36 horas mantiene la fertilidad cercana a la del semen fresco. El estrés oxidativo es un componente importante de la citopatología de los espermatozoides equinos sometidos al enfriado y a su almacenamiento. El daño a la cromatina, las membranas y las proteínas de los espermatozoides son componentes importantes del daño oxidativo en los espermatozoides. Una serie de cambios inducidos durante el procesamiento y almacenamiento del esperma equino también inducen cambios apoptóticos que puedan afectar negativamente a la supervivencia y la función de los espermatozoides. Para este estudio se utilizaron seis sementales: tres sementales de la Policía Montada de la Ciudad de México y los otros tres sementales de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas de la Ciudad de Victoria, Tamaulipas.

En este estudio se determinaron los cambios que existen en el semen y la susceptibilidad del ADN espermático a la desnaturalización entre los seis sementales durante su exposición a cuatro tiempos diferentes de almacenamiento en refrigeración utilizando el contenedor Equitainer. Para las pruebas convencionales (motilidad, viabilidad, reacción acrosomal) las muestras se evaluaron a la hora 0 con semen fresco sin diluir, y a las 12, 24 y 36 horas post colección, con el semen diluido con un diluyente tipo Kenny sin antibióticos elaborado por nosotros mismos, con las proporciones siguientes D1: 1:1, D2:1:2, D3:1:3 (D: dilución. Semen/partes de diluyente). Para las pruebas avanzadas (índice de la dispersión de la fragmentación del ADN) las muestras de semen se evaluaron sin diluir en los cuatro tiempos de refrigeración. Se realizaron 4 repeticiones con la metodología antes citada. Para valorar: motilidad, viabilidad, reacción acrosomal así como el índice de dispersión de la fragmentación de ADN a diferentes tiempos, se realizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA) con el paquete Rcommander y la prueba de supervivencia con el método Kaplan MEIER, el test Log Rank con el paquete estadístico de las ciencias sociales (SPSS) versión 24. Los resultados de las pruebas antes citadas determinaron estadísticamente los cambios que existen entre los diferentes sementales, en el semen fresco y entre los diferentes tiempos de exposición del semen a temperatura de **refrigeración**, permitiendo estimar la calidad del semen fresco (tiempo cero) y refrigerado (12, 24 y 36 horas) de los sementales evaluados. También se determinó que entre las pruebas convencionales utilizadas (motilidad, viabilidad) y las pruebas avanzadas de supervivencia (fragmentación del ADN) hubo una correlación negativa. Por lo tanto $P = 0.05$.

Palabras clave: espermatozoide, estrés oxidativo, semen equino refrigerado, Fragmentación de ADN, fertilidad.

ABSTRACT

Cryopreserved stallion semen quality and its relationship to DNA fragmentation dispersion index determined by *in vitro* fertilization

The use of cooled-shipped semen has become a routine method in the equine industry for mare insemination. This procedure provides a safe and less expensive way of breeding, as it avoids the risks associated with transportation of stallions to the location to the mares. Semen stored at **5°C** for about 36 hours maintains a fertilizing capacity close to that of fresh semen. Oxidative stress is an important component of the cytopathology of equine spermatozoa undergoing cooled semen storage. Damage to chromatin, membranes and proteins of sperm are important components of oxidative damage to sperm. A number of changes experienced during the processing and storage of equine sperm also appear to induce apoptotic-like changes which may adversely affect sperm survival and function. For this study six stallions were used, three stallions of Mounted Police from Mexico City and three stallions of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tamaulipas from Victoria City, Tamaulipas. In the present study the changes that exist in semen and sperm DNA susceptibility to denaturation of the six stallions were determined during exposure to four different times of refrigerated storage using the Equitainer container. For conventional tests (motility, viability, acrosome reaction) samples were evaluated at time 0 with fresh undiluted semen and 12, 24 and 36 h post collection, with semen diluted with a Kenny type diluent without antibiotics produced in house with the following dilutions D1: 1: 1, D2: 1: 2, D3: 1: 3 (semen / diluent parts). For advanced test (DNA fragmentation dispersion index) sperm samples were assessed undiluted at the four different times of refrigerated storage. Four replicates of the above methodology were performed. In order to assess: motility, viability, acrosome reaction and the DNA fragmentation dispersion index at different times, the analysis of variance (ANOVA) statistical test was performed with Rcommander package software. The sperm survivorship curves (i.e., survival rates) were determined using the Kaplan Meier Log Rank method with SPSS (Statistical package for the Social Sciences) version 24. The results of the above tests demonstrated statistically significant differences between stallions; among fresh and refrigerated semen at different exposure times, of refrigeration temperature. These tests allowed for the assessment of the quality of fresh and refrigerated semen of the six stallions. Based on the results there was not a correlation between conventional tests used (motility, viability) and advanced testing using the DNA fragmentation dispersion index. (P = 0.05).

Key words : Sperm, oxidative stress, equine cooled semen, DNA fragmentation, fertility.

III INTRODUCCIÓN

La refrigeración es uno de los métodos de conservación utilizados en la inseminación artificial, que nos permite preservar a los espermatozoides equinos por más tiempo en condiciones de fertilizar

Este método permite conservar semen de individuos de alto valor genético, para no llevarlos al lugar donde se encuentran las hembras.

La variabilidad en términos de la calidad del semen crioconservado entre sementales hace que sea difícil llegar a un método de crioconservación estandarizado.

Se han utilizado diferentes diluyentes y procesos técnicos para optimizar la calidad del semen fresco, refrigerado y congelado.

Una herramienta efectiva para evaluar dicha calidad es el análisis de integridad de la cromatina.

IV JUSTIFICACIÓN

La crio-conservación es una técnica reproductiva que permite conservar por más tiempo bajo condiciones de refrigeración o de congelación a los espermatozoides de individuos con un alto valor genético ya sea por su rendimiento deportivo o para preservar una raza en peligro de extinción. También evita llevar al semental al lugar de la monta, que se lastime durante el viaje o durante la monta; y sobre todo, facilita el hecho de inseminar diferentes yeguas en diferentes momentos utilizando un solo eyaculado. La calidad del semen varía según el semental y su raza. No todos los espermatozoides resisten los métodos de crio-conservación.

La inseminación artificial ofrece numerosas ventajas con respecto a la monta directa y en la actualidad varios **studbooks** ya lo autorizan.

La inseminación artificial puede limitar las enfermedades sexualmente transmisibles. En la conservación del semen se pueden agregar antibióticos o sustancias que pueden aumentar la longevidad de los espermatozoides.

V HIPÓTESIS

Las pruebas para la evaluación de la calidad del semen refrigerado de caballos están directamente relacionadas con el Índice de Fragmentación de ADN espermático y permiten seleccionar a los sementales cuyo semen refrigerado presente las mejores características al ser calentado a 37°C.

VI OBJETIVOS

1.-Objetivo general

Evaluar la calidad del semen de caballos después de haber sido refrigerado por diferentes periodos de tiempo y dilución.

2.-Objetivos específicos

Evaluar la calidad del semen refrigerado y atemperado de caballos utilizando técnicas tradicionales o convencionales y avanzadas.

Evaluar la integridad del ADN espermático en el semen refrigerado y entibiado de caballos utilizando la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática para obtener el Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN espermático.

Determinar si existe una correlación entre los resultados obtenidos con las técnicas convencionales y las técnicas avanzadas (motilidad, morfología, viabilidad, estado del acrosoma e integridad de la membrana plasmática) con el Índice de Dispersión de la Fragmentación del ADN espermático.

VII ANTECEDENTES GENERALES

A) ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR EQUINO

El aparato reproductor masculino se divide en:

- Una parte glandular, donde la función de los dos testículos es formar a los espermatozoides y desarrollar las hormonas masculinas.
- Una parte tubular, donde las vías espermáticas llevan a los espermatozoides del interior de los testículos al exterior por el epidídimo y luego los conducto deferentes hasta la uretra.
- Una parte uro-genital, que es común a las vías urinarias y a la parte genital. Compuesta en si de dos partes: la uretra pélvica situada en la pelvis y la uretra peneana o esponjosa que desemboca al meato urinario. En esta parte se encuentran las glándulas reproductoras accesorias que con sus secreciones participan a la nutrición de los espermatozoides y para limpiar y lubricar la uretra antes de su expulsión.

1.- LOS TESTÍCULOS

Los testículos se encuentran protegidos por varias capas:

- Tiene dos capas superficiales:
 - El escroto que se sitúa en la región subinguinal y debajo del anillo inguinal superficial, el cual está formado por:
 - la piel que contiene glándulas sebáceas.

- el dartos, constituido de fibras elásticas y músculos lisos y de colágeno, que tienen como función regular la temperatura de los testículos.
 - La fascia espermática externa.
- Y tres capas profundas:
 - El músculo cremaster, compuesto de fibras estriadas con motricidad involuntaria, sale del intersticio inguinal y envuelve en parte el cordón testicular. Su contracción provoca la ascensión de los testículos y de sus capas contra el anillo inguinal superficial.
 - La fascia espermática interna.
 - Las tunicas vaginales.

Los testículos del semental pesan alrededor de 200g y miden 10x6x5 cm. Los testículos realizan dos funciones una germinal (la espermatogénesis) al nivel de los tubos seminíferos gracias a las células de Sertoli y una función endocrina sintetizando las hormonas sexuales por las células de Leydig (Thibault, 2001; Baronne, 2001).

2.- EL EPIDÍDIMO

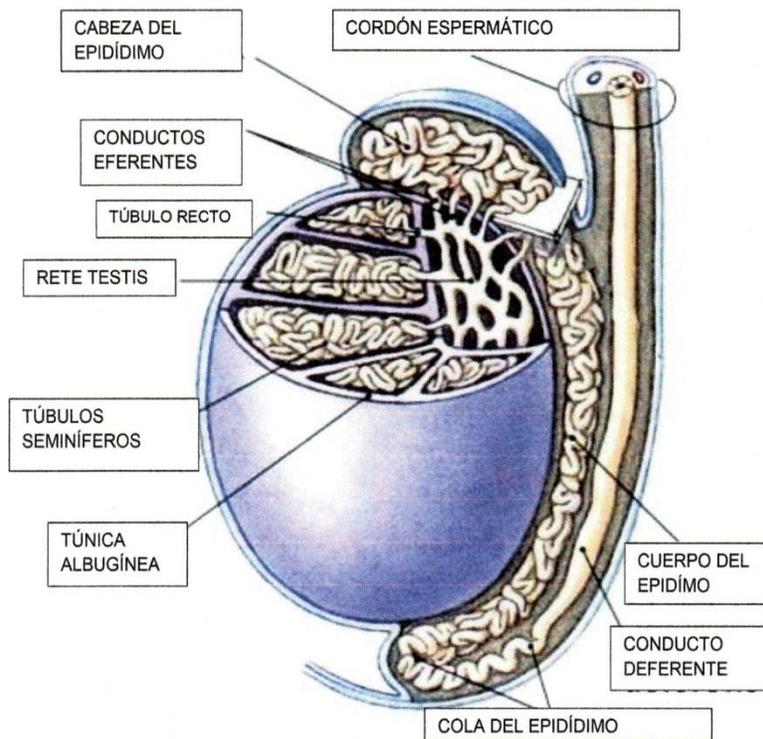


FIG. 1 Esquema del testículo y del epidídimo. (Johnston *et al.*, 2005)

2.1 Generalidades del epidídimo

La formación de los gametos masculinos se efectúa en el testículo. Sin embargo a su salida los espermatozoides no son maduros, ni móviles, ni fecundantes.

En el epidídimo los espermatozoides continúan transformándose hasta su maduración y poder reconocer y fecundar al ovocito. (Thibault, 2001).

El epidídimo es un conducto contorneado que en el semental mide 80m y está compuesto de tres partes, la cabeza el cuerpo y la cola. La cola del epidídimo se conecta con el conducto deferente. El conducto deferente se palpa en el cordón espermático (Baronne, 2001).

2.2 Funciones del epidídimo

El epidídimo realiza varias funciones: en la cabeza y el cuerpo realiza el transporte, la concentración y la maduración de los espermatozoides y en la cola realiza el almacenamiento de los espermatozoides (Dacheux y Dacheux., 2001).

2.3 El líquido epididimario

La composición del líquido epididimario cambia a lo largo del epidídimo. Esta característica se debe a las secreciones y a las reabsorciones que pasan en los tubos seminíferos y en el epidídimo pero también a los intercambios restringidos con la sangre y la barrera hemato testicular epididimaria. Esta barrera está formada por la relación estrecha entre las células de Sertoli en el testículo y entre las células epiteliales epididimarias (Dacheux y Dacheux., 2002) (Hoffer y Hinton, 1984) (Pelletier y Byers, 1992).

2.4 Las células del epitelio epididimario

El epitelio epididimario está constituido por diferentes tipos de células: Células principales, apicales, claras, en halo y células basales (Herme y Robaire, 2002).

- Las células principales presentan un núcleo basal, esterocilios que disminuyen de tamaño entre la cabeza y la cola del epidídimo. Son células prismáticas muy activas en cuanto al transporte y a la secreción de pequeñas moléculas orgánicas, a la síntesis y a la secreción de proteínas y a la absorción del líquido y de partículas (Robaire y Viger, 1995).

- Las células apicales se encuentran principalmente en la cabeza del epidídimo, tienen un núcleo esférico en posición apical y no tienen contacto con la membrana basal. Su citoplasma es rico en mitocondrias (Martinez-García *et al.*, 1995). Ellas son capaces de realizar endocitosis (Herme y Robaire, 2002) e intervienen en la acidificación del líquido epididimario (Martinez-García *et al.*, 1995).

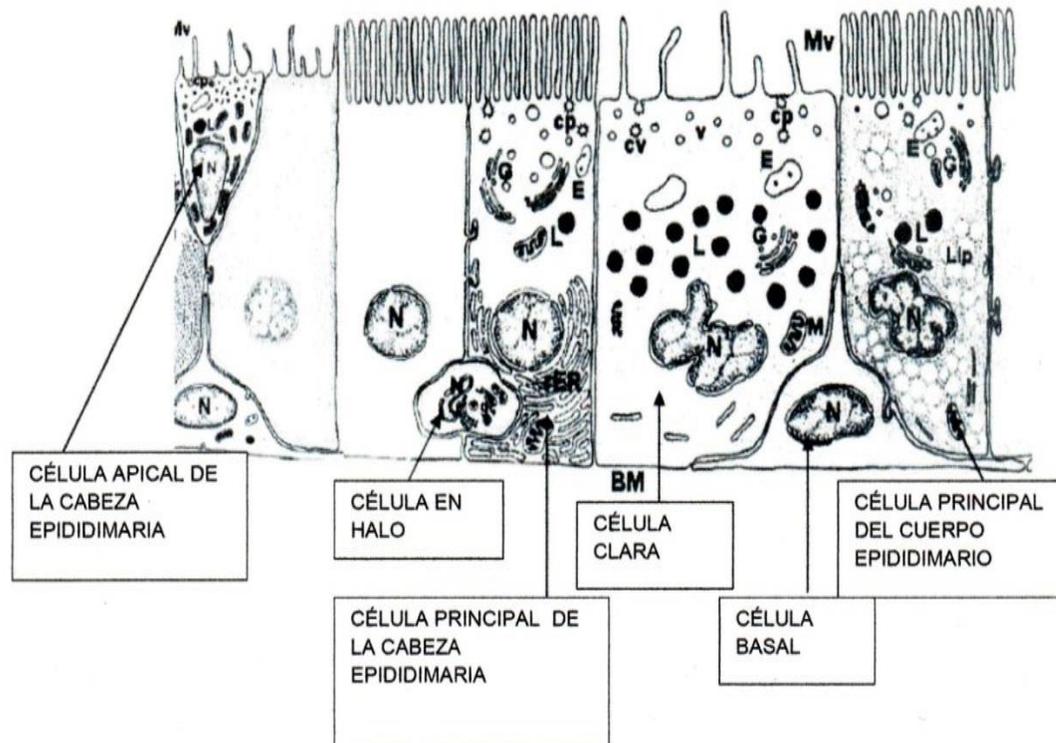


FIG. 2 Representaciones de los diferentes tipos celulares epididimarios de los mamíferos.

Cp: pozos cubiertos, E: endosomas, L: lisosomas, G: Aparato de Golgi. rER : retículo endoplásmico rugoso, lip : gotas lipídicas, Mv : microvellosidades, BM : membrana basal, N: núcleo, v: vesículas apicales (Hermo y Robaire, 2002)

- Las células claras son anchas, contienen vesículas de tamaños diferentes en la región apical, lisosomas en la región media y gotas lipídicas en su parte basal (Martinez-García *et al.*, 1995). Esta distribución le permite eliminar material desde la luz epididimaria y realizar endocitosis (Scarlett *et al.*, 2001). También se les atribuye la acidificación del fluido epididimario (Beaulieu *et al.*, 2004; Hermo y Robaire, 2002).
- Las células en halo son pequeñas y se encuentran a lo largo del epidídimo generalmente situadas en la base del epitelio (Hermo y Robaire, 2002). Estas células pueden intervenir en la respuesta inmune innata de este tejido que escapa a la respuesta inmune adaptativa a causa de la barrera hemato- epididimaria.
- Las células basales se encuentran a lo largo del canal epididimario, tienen una forma hemisférica, se adhieren a la membrana basal y no tienen acceso directo a la luz del tubo pero presentan extensiones hasta la luz. Tienen pozos recubiertos sobre la parte opuesta a la membrana basal y a lo largo de las células principales, sugiriendo una endocitosis mediada por los receptores (Hermo y Robaire, 2002).

2.5 Modificaciones que sufre el espermatozoide durante su paso por el epidídimo

Estos diferentes tipos de células modifican al espermatozoide durante su paso por el epidídimo. Estas modificaciones comprenden cambios en la composición en los lípidos de la membrana plásmica, reorganización de sus dominios membrenarios, agregación, la eliminación o la modificación bioquímica de las proteínas. El espermatozoide no presenta actividad de síntesis a causa de la condensación muy importante en su núcleo y de su estado haploide, las modificaciones que sufre por su paso en el epidídimo son debidas esencialmente por los componentes del líquido epididimario (Dadoune *et al.*, 2004).

2.6 La condensación de la cromatina

Durante la espermatogénesis, la cromatina de los espermatozoides de los mamíferos sufren una reorganización donde las histonas y las proteínas no histonas son remplazadas por las protaminas. En los espermatozoides maduros esta reorganización mantiene el ADN compactado y transcripcionalmente inactivo hasta que eventualmente fecunde un ovocito. En la mayor parte de los mamíferos eutherianos, las protaminas ricas en cisteínas que se localizan en el pequeño surco del ADN y se unen por los puentes de disulfuro durante su paso por el epidídimo para darle estabilidad a la estructura. El estatus de óxido reducción (REDOX) del epidídimo interviene en la formación de los puentes de disulfuro durante la maduración epididimaria por ejemplo con la glutatión peroxidasa 4 localizada en las protaminas (Godeas *et al.*, 1997).

2.7 Regulación del volumen del espermatozoide

El espermatozoide es una célula que casi no tiene citoplasma, es por eso que el control de su volumen es muy importante. Las secreciones del líquido epididimario mantiene a los espermatozoides en un medio particular cuanto a pH, la tensión en oxígeno y el tipo de substratos energéticos. Gran parte de los líquidos testiculares se reabsorben en la primeras regiones del epidídimo (Dacheux y Dacheux., 2001).

La reabsorción del agua asociada al movimiento de los iones (reabsorción de Na⁺ y Cl⁻, secreción de los iones K⁺ y fosfatos) conlleva a una disminución de un factor 10 en la relación Na⁺/K⁺ en el líquido entre la cabeza y la cola del epidídimo (Dacheux y Dacheux., 2001). Otra molécula importante en el líquido epididimario es la carnitina que interviene en el metabolismo de los lípidos. La carnitina se concentra por el transporte activo a partir de la sangre; y aumenta su concentración en el líquido epididimario conforme a su tránsito en el epidídimo.

En los mamíferos la carnitina es captada por los espermatozoides transformada en acetil-carnitina que se acumula durante la maduración y que será utilizada como sustrato energético para la motilidad (Dacheux y Dacheux., 2001).

Las diferentes secreciones y reabsorciones hacen que el epidídimo sea un medio hipertónico con respecto al espermatozoide.

El flujo de salida del agua hace que el espermatozoide reduzca su volumen durante su maduración, reduciendo el tamaño de la cabeza del espermatozoide.

Los electrolitos producidos por el epitelio epididimario son acumulados en el líquido epididimario, estos electrolitos evitan que los espermatozoides se deshidraten (Cooper y Yeung, 2003).

Uno de los resultados de la maduración espermática epididimaria es la adquisición de los espermatozoides de la capacidad de regular su volumen, esta capacidad es indispensable para la fecundación (Cooper y Yeung, 2003). Se demostró que hay una relación directa entre el volumen de la cabeza de un espermatozoide y su motilidad rectilínea. Estos resultados fueron confirmados por diferentes experiencias de transgenesis en las cuales la desdiferenciación del epitelio epididimario se asocia a espermatozoides que no regulan su volumen, no presentan motilidad rectilínea y por consiguiente no son fecundantes (Sipila *et al.*, 2002; Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996; Yeung *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2000).

Un efecto visible de la modificación del líquido epididimario y de la importancia de la regulación del volumen espermático es la desaparición de la gota citoplasmática. La gota es el residuo del citoplasma de la célula germinal que es en gran parte fagocitada por las células de Sertoli al momento donde la espermátide alargada deja el epitelio seminífero para ser un espermatozoide testicular libre. Durante el tránsito de la cabeza al cuerpo epididimario la gota se desliza desde la base de la cabeza del espermatozoide hasta la extremidad de la pieza media del flagelo, para desaparecer en la cola del epidídimo durante o después de la eyaculación según las especies (Cooper y Yeung, 2003).

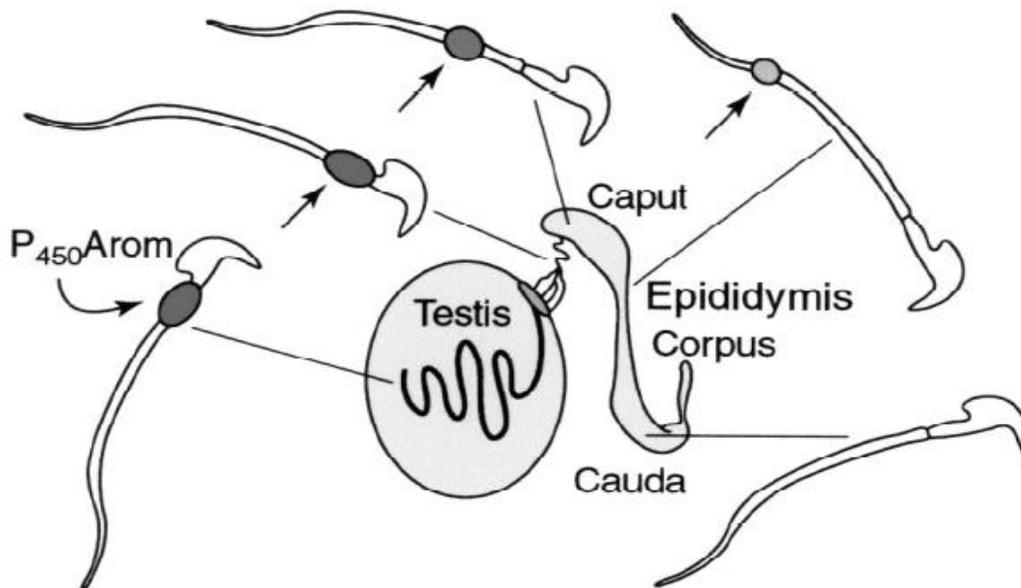


FIG. 3 Representación de la migración de la gota citoplasmática a lo largo del espermatozoide durante su paso por el testículo y el epidídimo. (Hess *et al.*, 2001)

En varias especies como en el toro ,el verraco, el ratón , existe una persistencia de la gota citoplasmática que puede estar asociada a una infertilidad masculina (Cooper, 2005).

2.8 Modificaciones del acrosoma durante su paso en el epidídimo

El desarrollo del acrosoma se efectua durante la espermiogénesis pero durante su paso por el epidídimo sufre cambios, esto se ha observado en varias especies (Scarlett *et al.*, 2001).

El remodelaje del acrosoma en el epidídimo implica una reducción de su tamaño, una alteración de su forma y un cambio en el contenido acrosómico. Una comparación entre los espermatozoides de la cabeza con los de la cola epididimaria del hamster muestra una diferencia de organización del citoesqueleto (Olson *et al.*, 2003). Los espermatozoides de la cola del epidídimo tienen un citoesqueleto organizado mientras que los espermatozoides de la cabeza no muestran esta organización. De manera general estas modificaciones estructurales pueden reflejar modificaciones bioquímicas necesarias a las funciones del acrosoma.

2.9 Modificaciones de las proteínas en el epidídimo

Las proteínas pueden intervenir de diferente manera en la maduración espermática. Ellas pueden modificar de manera directa o indirecta la composición de la membrana plasmática o contribuir a la preservación de la integridad celular.

Las proteínas testiculares entran en el epidídimo y son absorbidas en las primeras regiones del órgano. Las proteínas epididimarias son secretadas en la parte anterior del epidídimo (Syntin *et al.*,1996).

La secreción protéica en la cabeza, cuerpo y cola representan 83%,16% y 1% respectivamente de la totalidad de las secreciones epididimarias (Dacheux *et al.*, 2003).

En el semental 73% de las secreciones epididimarias totales tienen lugar en la luz de la cabeza del epidídimo (Fouchecourt *et al.*,2000).

El epitelio epididimario según las especies secreta globalmente las mismas proteínas.

El líquido epididimario del equino secreta 250 proteínas, de las cuales 18 de entre ellas representan mas del 92% de su actividad secretora; las mas relevantes en el equino son la lactoferrina que representa 41% y la clusterina 25% de su actividad secretora. (Fouchecourt *et al.*,2000).

La secreción secuencial de las diferentes proteínas a todo lo largo del epidídimo es una de las causas de los cambios de composición del líquido epididimario. Otra razón es la reabsorción específica de ciertas proteínas en el órgano. Ciertas proteínas son reabsorbidas luego de ser secretadas como la proteína **train A** en el verraco y ciertas isoformas de la clusterina en los equinos y otras se quedan

presentes a todo lo largo del órgano como la prostaglandina D2 sintetasa en varias especies (Dacheux *et al.*, 2003).

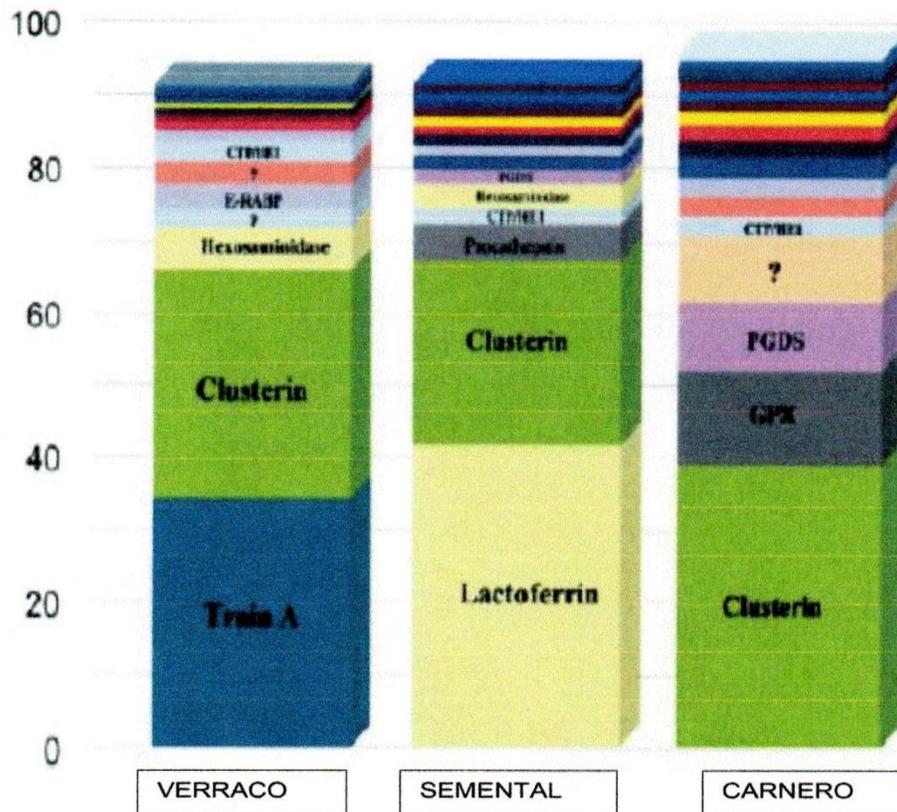


FIG.4 Principales proteínas epididimarias secretadas en tres especies, expresadas en porcentaje según su secreción total.

CTP/HE1: Colesterol transferasa de proteína (ECTP), E-RABP: Proteína de unión a ácido retinoico epididimal, GPX: Glutación Peroxidasa, PDGS: Prostaglandina D2 Sintetasa (Dacheux *et al.*, 2003).

2.10 Proteínas que intervienen en la motilidad espermática en el epidídimo

Mientras que los espermatozoides se encuentran en el epidídimo no presentan motilidad propia a pesar que durante su tránsito en el epidídimo adquieran la capacidad a la motilidad.

En el epidídimo, la progresión de los espermatozoides al inicio se debe a las secreciones del testículo, a los cilios epiteliales y a la contracción de los músculos lisos del canal epididimario. La amplitud de las contracciones de los músculos lisos aumenta de la cabeza hacia la cola proximal del epidídimo, mientras que la frecuencia decrece progresivamente. La inmovilidad de los espermatozoides en el epidídimo es debido a la presencia de una glicoproteína que forma un moco que envuelve a los espermatozoides. Esta proteína sintetizada por las células

principales de la cabeza del epidídimo se llama inobilina (Hermo y Robaire, 2002).

La capacidad de los espermatozoides a ser motiles evoluciona durante su tránsito en el epidídimo. Incubados en un medio adecuado, los espermatozoides que provienen de la cabeza del epidídimo no son motiles o presentan movimientos no progresivos del flagelo, sin embargo se observó progresión en los espermatozoides del cuerpo y de la cola del epidídimo (Hermo y Robaire, 2002).

En la rata se encontró la proteína **bin 1b** que interviene en la adquisición de la motilidad de los espermatozoides y en el hombre se encontró una proteína homóloga a la **bin 1b** (Zhou *et al.*, 2004).

2.11 Protección antioxidante durante el tránsito del espermatozoide en el epidídimo

La membrana de los espermatozoides es rica en ácidos grasos poliinsaturados, esto los hace susceptibles a las especies reactivas de oxígeno (ROS), derivadas del metabolismo del oxígeno. Los ROS afectan los lípidos y las proteínas del ADN. Los ROS pueden causar una peroxidación lipídica de la membrana plasmática espermática, afectar a la estructura del axonema, causar problemas durante la capacitación o en la reacción acrosomal y una pérdida de motilidad, todo esto llevando a la infertilidad (Tramer *et al.*, 1998).

El espermatozoide produce en condiciones fisiológicas los ROS. Esta producción puede estar relacionada a la persistencia de un exceso de citoplasma residual en las últimas etapas de la espermiogénesis (Aitken, 2002).

La producción de ROS en baja cantidad es necesaria para que se realicen diferentes funciones espermáticas como la activación de la motilidad, la capacitación, la reacción acrosomal y la hiperactivación (Aitken, 2002).

La cantidad de los ROS en el medio de los espermatozoides debe estar controlado de forma estricta sobre todo en el epidídimo donde pueden permanecer varios días o semanas. Esta regulación la controlan los antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos que se encuentran en el epidídimo y protegerán a los espermatozoides durante su paso y su maduración en el epidídimo (Aitken, 2002).

Los espermatozoides tienen fuertes concentraciones de grupos tioles libres y pequeñas cantidades de ácido úrico y ascórbico, de glutatión reducido y vitamina E que son antioxidantes. La vitamina E se encuentra en gran cantidad en los espermatozoides de la cabeza y con menor cantidad que en los de la cola del epidídimo: la vitamina E disminuye durante la maduración espermática en la rata (Tramer *et al.*, 1998).

Entre las enzimas antioxidantes presentes en el epidídimo y/o en el espermatozoide se encuentran: la superóxido dismutasa, la catalasa, las glutatión peroxidasa y la indolamina dioxigenasa. (Tramer *et al.*, 1998).

3.- EL CONDUCTO DEFERENTE

A la salida del epidídimo, los espermatozoides son fértiles y motiles. Los espermatozoides transitan por el conducto deferente por el movimiento de sus flagelos y las contracciones de las fibras musculares de la pared del conducto deferente para después ser almacenados en las ámpulas del conducto deferente justo antes de la uretra. Este almacenamiento no debe de durar mucho tiempo pues después de 72h los espermatozoides pierden su poder fecundante. Si no hay eyaculación los espermatozoides degeneran, son reabsorbidos o pasan a la orina. Si hay eyaculación, el conducto deferente libera el semen, el líquido testicular y las secreciones de las glándulas anexas. (Thibault, 2001). El conducto deferente está constituido de tres partes: una parte funicular situada en el cordón espermático, una parte abdominal y pelviana después del intersticio inguinal y la ámpula por encima de la vesícula (Baronne, 2001).

4.- LA URETRA

La uretra pelviana empieza más allá del cuello de la vesícula y se termina por encima del cuello isquiático. Está compuesta por una parte prostática y una parte membranácea que contiene un músculo esfínter. La próstata vierte su secreción en la uretra pelviana por los numerosos conductos prostáticos. Las glándulas de Cowper se encuentran en la uretra pelviana. La uretra peneana empieza enfrente de la arcada isquiática por una dilatación y se adhiere a los otros elementos eréctiles, situándose en el cuerpo esponjoso. (Baronne, 2001)

5.- LAS GLÁNDULAS ANEXAS

5.1 Las vesículas seminales

Son glándulas túbulo-alveolares. Las vesículas seminales y el conducto deferente terminan en un conducto común, el conducto eyaculador que desemboca en la uretra. Las células epiteliales de las vesículas seminales secretan proteínas (enzimas, inhibidores de enzimas, proteínas estructurales) y moco gelatinoso, espeso y blanco, compuesto de fructuosa y de prostaglandinas (Baronne, 2001; Thibault, 2001).

5.2 La próstata

Es una glándula bilobulada que se encuentra sobre el cuello de la vesícula de una parte y de otra de la uretra. En cada lóbulo se encuentran glándulas túbulo-alveolares de tipo seroso, cuyas secreciones llegan a la uretra (Baronne y Vigot, 2001).

El líquido prostático es rico en ácidos aminados y en enzimas (fosfatasa alcalinas y ácidas), este líquido permite neutralizar la acidez que está ligada al metabolismo de los espermatozoides. Esta acidez se debe a la producción de lactato por el

dióxido de carbono (CO₂). El líquido prostático provoca la motilidad de los espermatozoides.

La actividad de la próstata está bajo la dependencia de los andrógenos (Thibault, 2001).

5.3 Las glándulas de Cowper o glándulas bulbouretrales

Ellas emiten su contenido al nivel de la uretra membranosa, este líquido es albuminoso y transparente. La erección comprime a las glándulas de Cowper dejando así salir su contenido (Baronne, 2001).

B) EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DEL SEMENTAL

El semen puede ser colectado todo el año sin embargo el comportamiento sexual del semental se exagera con el periodo reproductivo de la yegua.

Un semen de buena calidad está asociado a una buena libido y a una buena monta (Blanchard, 2003).

El comportamiento sexual del semental se juzga en presencia de una yegua en estro. Una buena libido se manifiesta por una atracción del semental hacia la yegua caracterizada por agitación, por vocalización, levantar las patas, una actividad precopulatriz intensa, olfateo de la vulva, lamerla, mordisqueos a la yegua, el refejo de Flehmen, (levantamiento del labio superior al oler la parte genital o de la orina de la yegua) y la erección del pene. Una causa de la baja de la libido es la sobreexplotación del semental (Blanchard, 2003).

1.- EL MECANISMO DE ERECCIÓN

La erección está controlada por el sistema nervioso autónomo, el mecanismo de la erección es puramente vascular. Las cavidades del tejido eréctil se llenan de sangre a lo largo del pene pasando de 60 cm. a 90 cm. También se observa un aumento del diámetro del glande (10 cm de diámetro). El sistema ortosimpático, vía el nervio hipogástrico, permite el llenado de las lagunas por la sangre actuando en la vasomotriz del cuerpo cavernoso y tiene un efecto excitante y secretor sobre las glándulas anexas. El sistema parasimpático provoca la erección del cuerpo esponjoso de la uretra y del cuerpo eréctil del glande vía el nervio erector (rama del nervio pudendo, el nervio pudendo asegura la innervación sensitiva del periné, del escroto y del pene), (Blanchard, 2003; Heymon y Vignon., 2005).

2.- EL SEMEN EQUINO

El semen está compuesto por espermatozoides, líquido testicular y secreciones de las glándulas anexas. El semen es eliminado por el meato urinario durante la eyaculación, la cantidad de semen eyaculado es en promedio de 100 cm³. (Knobil y Neill., 1999).

Una parte del eyaculado está formado por una parte líquida en donde se encuentran los espermatozoides y una parte gelatinosa, el plasma seminal.

El semen es eyaculado en series de 5 a 8 pulsos o jets. La primera parte del líquido testicular no contiene espermatozoides y se origina de las glándulas bulbouretrales, después sale la fracción rica en espermatozoides, seguida de una tercera fracción que contiene pocos espermatozoides y una gran cantidad de gel proveniente de las vesículas seminales (Kosniak, 1975).

Recién que se colecta el semen y una vez que se quita el plasma debe medirse el pH inmediatamente. Un pH normal oscila entre 7.2 y 7.7. El pH sufre variaciones fisiológicas según la temporada, la frecuencia de los eyaculados y la concentración. Un pH superior a 7.7 puede indicar una infección o una inflamación del aparato genital interno, una contaminación por la orina u otro producto alcalino como el jabón o una eyaculación incompleta. El pH también puede afectarse por el método de colección y por el tipo de lubricante utilizado. Los cambios de pH y de osmolaridad provocados por la urospermia afectan la motilidad de los espermatozoides (Tibary, 2005; Heymon y Vignon., 2005).

El color normal del eyaculado equino es de grisáceo a blanquecino según la concentración en espermatozoides. Este color puede ser rosa, rojizo o rojo vivo cuando el semen tiene sangre (hemospermia). Un color amarillento puede señalar la presencia de orina (urospermia) o con pus (piospermia).

3.- LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL SEMEN

El semen contiene: 80% de agua, 6% de materia orgánica, iones (calcio, fosfato), lípidos, glúcidos, albúminas y globulinas, bases aminadas. (Heymon y Vignon., 2005; Thibault, 2001).

4.- LA FORMACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

La formación de los espermatozoides se hace en dos etapas: la espermatogénesis y la espermiogénesis; las cuales empiezan al nivel de los tubos seminíferos. Después en el epidídimo se realiza su maduración. La duración de la formación del espermatozoide es de 49 días en el semental (Heymon y Vignon., 2005; Thibault, 2001).

4.1 La espermatogénesis

La espermatogénesis ocurre en los testículos, en primer lugar en los tubos seminíferos. La espermatogénesis comienza después de la pubertad con la acción de la hormona luteinizante (LH) sobre las células de Leydig y de la hormona folículo-estimulante (FSH) sobre las células de Sertoli (Heymon y Vignon., 2005; Thibault, 2001).

La línea germinal masculina está constituida de dos tipos de espermatogonias, las espermatogonias de tipo A (células madre) y las espermatogonias tipo B que provienen de las anteriores. Las espermatogonias de tipo B se dividen para formar los espermatoцитos primarios. Los espermatoцитos primarios sufren cambios nucleares progresivos de profase meiótica conocida como preleptotena, leptotena,

cigotena, paquitena, y diplotena antes de dividirse para formar los espermatozoides secundarios. Los espermatozoides de la diplotena primaria contienen alrededor del doble del contenido de ADN de las células somáticas. Los espermatozoides primarios sufren diacinesis y se dividen para formar espermatozoides secundarios. Los espermatozoides secundarios resultantes se dividen de nuevo sin que haya una síntesis adicional de ADN y forman las células haploides conocidas como espermátides. (Hafez, 1984)

La transición entre espermatogonia y espermatozoides I está marcado por una ligera fase de crecimiento que corresponde a las síntesis de ácido ribonucleico (ARN). La mayor parte de esos ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) son transcritos en profase meiótica y traducidos a los estados de espermátide o espermatozoides. El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) es el que codifica las proteínas que intervienen en la motilidad del espermatozoides o al reconocimiento del ovulo por el espermatozoides (Heymon y Vignon., 2005; Thibault, 2001).

Durante las etapas correspondientes al espermatozoides II y a la espermátide, hay todavía síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que se traducen tardíamente en las transformaciones del espermatozoides (Heymon y Vignon., 2005).

En el semental la espermatogénesis permite producir 16×10^6 espermatozoides por día por gramo de testículo (Heymon y Vignon, 2005).

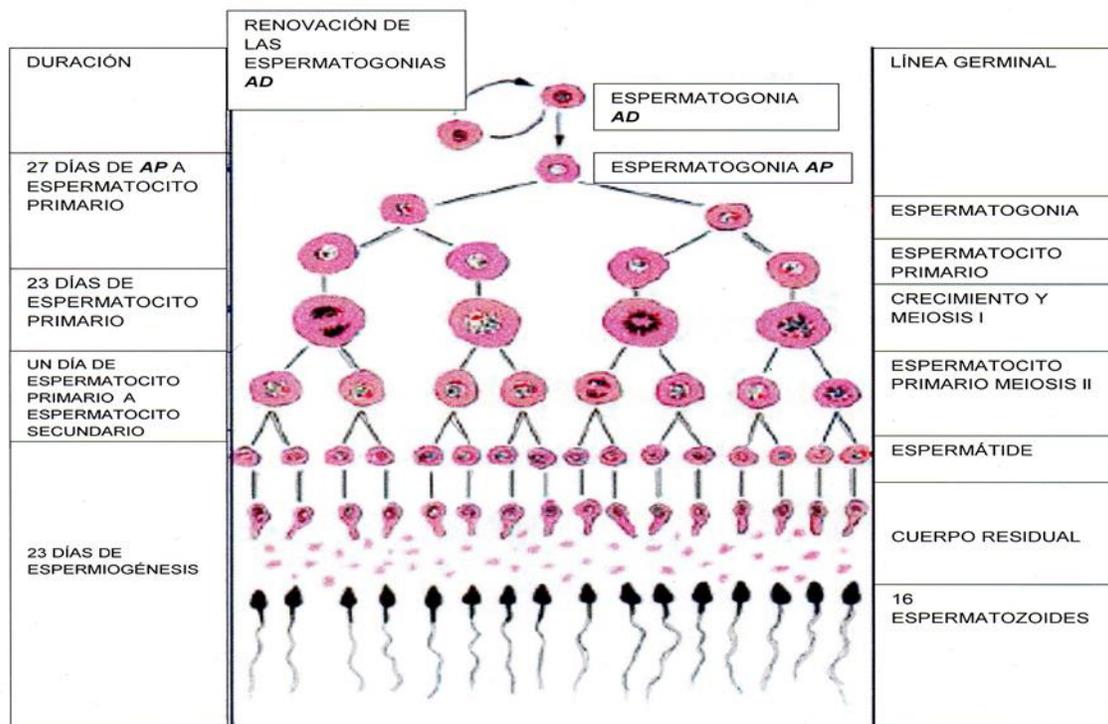


FIG. 5 La espermatogénesis por Nicole Vacheret (1) adaptado de Thibault, 2001.

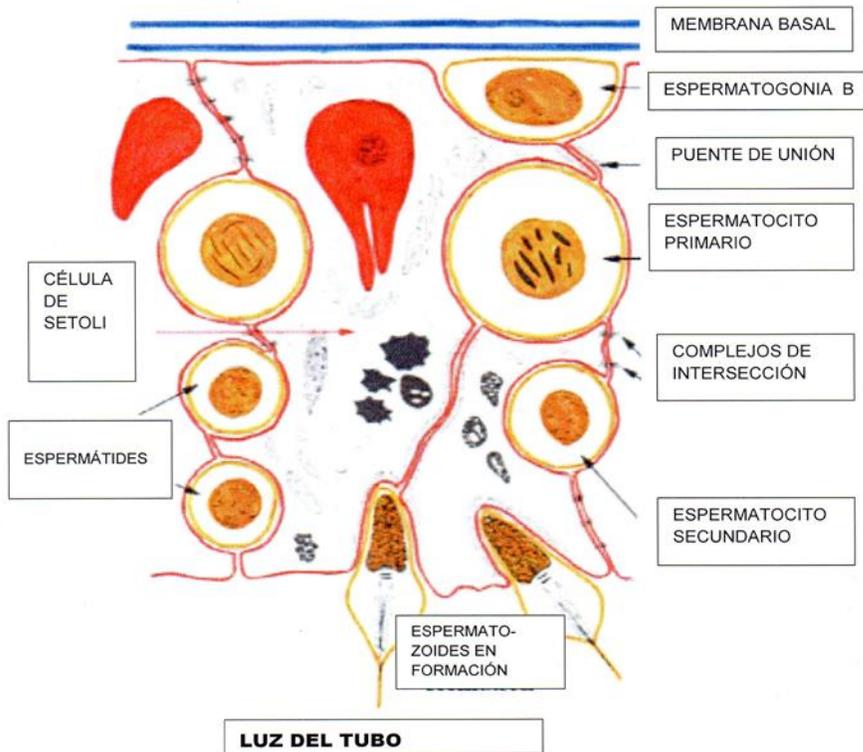


FIG. 6 La espermatogénesis por Nicole Vacheret (2) adaptado de Thibault, 2001.

4.2 La espermiogénesis

La espermiogénesis permite el paso de la espermátide a espermatozoide.

La espermiogénesis se caracteriza por:

- Una condensación nuclear:

Las histonas ricas en lisina, son eliminadas y reemplazadas por protaminas. Las protaminas son proteínas básicas de bajo peso molecular ricas en arginina y cisteínas. El nucléolo desaparece, los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) nucleares son eliminados y el núcleo se deshidrata; el conjunto del núcleo se convierte en una masa compacta de heterocromatina (Heymon y Vignon, 2005; Thibault, 2001).

- La formación del acrosoma:

El acrosoma se forma por la confluencia de las vesículas de Golgi; primero se forma una vesícula redonda, la vesícula proacrosomal que se sitúa al opuesto del aparato cinético y da la vesícula acrosomal para luego ser el acrosoma. El acrosoma continúa creciendo con respecto a las vesículas de Golgi, después se extiende sobre la parte superior del núcleo (Heymon y Vignon, 2005; Thibault, 2001).

- La diferenciación del aparato cinético:

El complejo centriolar, vecino de la vesícula proacrosomal, migra al contrario del núcleo. El centriolo proximal se posiciona en una invaginación de la membrana nuclear, mientras que el centriolo distal induce la polimerización de un axonema. Las mitocondrias se organizan en forma de un manguito a la base del axonema. (Heymon y Vignon, 2005; Thibault, 2001).

- La eliminación del citoplasma:

Lo esencial del citoplasma es primero eliminado y fagocitado por las células de Sertoli y solo una gota del citoplasma persiste en la base del flagelo que será eliminado a su paso en el epidídimo. (Heymon y Vignon, 2005; Thibault, 2001).

Los espermatozoides al salir del testículo todavía aun no tienen la capacidad de fecundar al óvulo, permanecerán en el epidídimo y seguirán madurando. (Heymon y Vignon, 2005; Thibault, 2001).

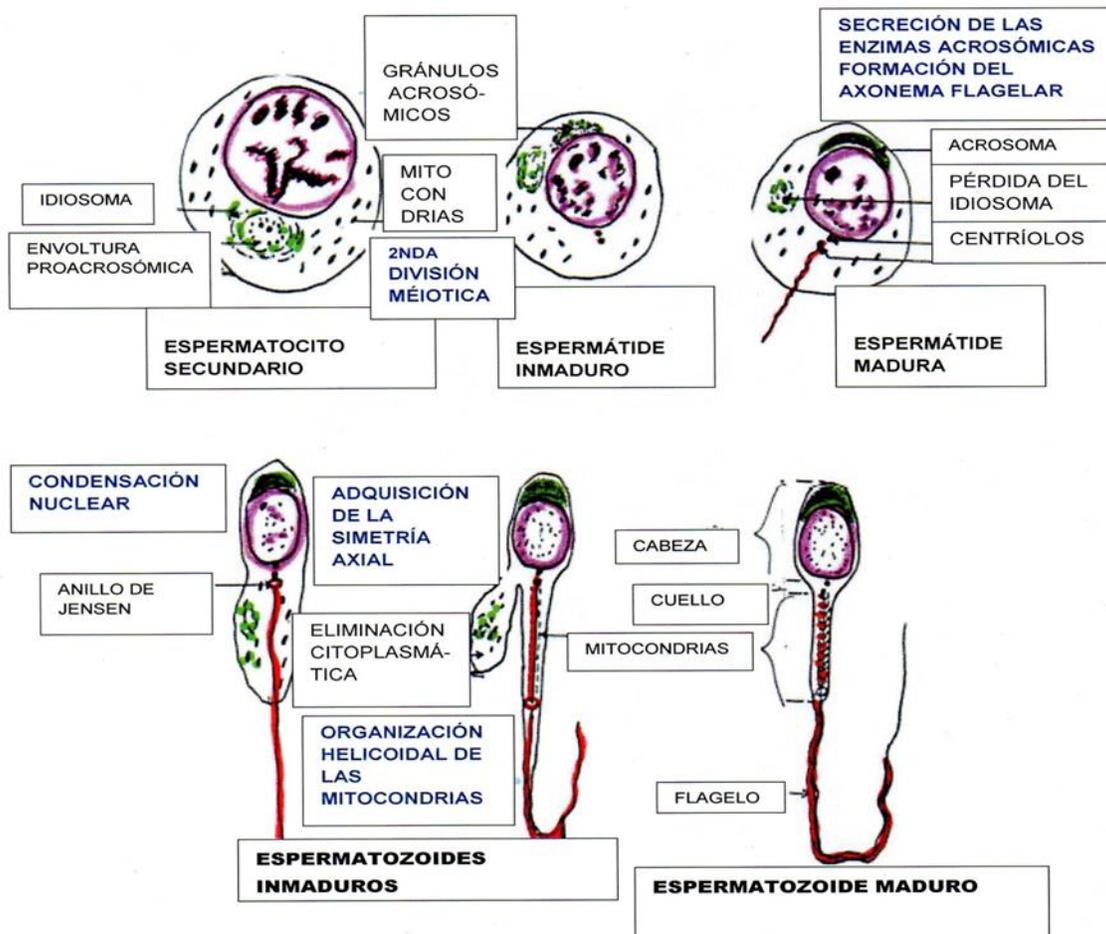


FIG.7 Formación del acrosoma durante la espermiogénesis. (Thibault, 2001; Chan *et al.*, 2006)

5.- FACTORES QUE ALTERAN LA FORMACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

- Deficiencias gonadotrópicas

Corresponden a la ausencia de estimulación hormonal del testículo por deficiencia de secreción de gonadotropinas. Lo más frecuente es que haya deficiencia de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo-estimulante (FSH), con una falta de estimulación de las funciones de ambos testículos (Thibault, 2001).

- Daños primitivos de la espermatogénesis.

El problema patológico inicial puede estar en el testículo (Thibault, 2001).

En la hipoespermatogénesis el número de los tubos seminíferos y de las células germinales está disminuido (Thibault, 2001).

El bloqueo de la espermatogénesis en el estado de espermatocono I, de espermatocono II o de espermátide (Thibault, 2001).

La aplasia germinal: ausencia total de células de la línea germinal (células madre de los espermatozoides) (Thibault, 2001).

La esclero-hialinosis: la arquitectura histológica del testículo se observa con los tubos seminíferos atróficos de espesor reducido, de aspecto hialinoso y de fibrosis.

Diversas anomalías se encuentran asociadas a problemas de la espermatogénesis:

- anomalías cromosómicas (delección del brazo largo del cromosoma Y) (Thibault, 2001).

- varicocele (dilatación de las venas del cordón espermático) (Thibault, 2001).

- criptorquidia: una probable alteración en la constitución del testículo debido a un problema en el descenso testicular durante la vida intra uterina y se manifiesta también más tarde en la vida por un problema en la espermatogénesis (Thibault, 2001).

- patología infecciosa genital o general (orquitis, epididimitis, espermatoconitis).

Strongylus edentatus productor de orquitis, epididimitis y periorquitis en el testículo criptorquidio (Edwards, 2008).

- alteración isquémica o traumática del testículo.

- hipertermia

- subnutrición.

6.- ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide tiene como función: el transporte del contenido cromosómico masculino hasta el gameto femenino, la penetración del genoma masculino en el gameto femenino y la fusión de los dos núcleos gaméticos o cariogamia produciendo el cigoto (Knobil y Neill., 1999).

El espermatozoide se divide en cabeza, pieza intermediaria y filamento axial.

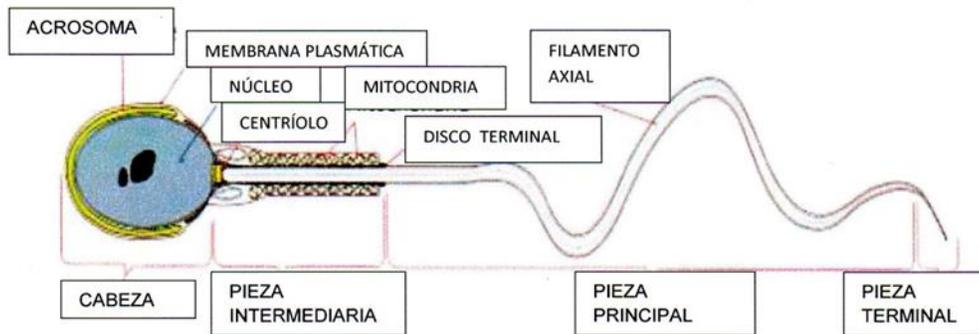


FIG.8 Estructura del espermatozoide por Mariana Ruíz (1) adaptado de Knobil y Neill., 1999.

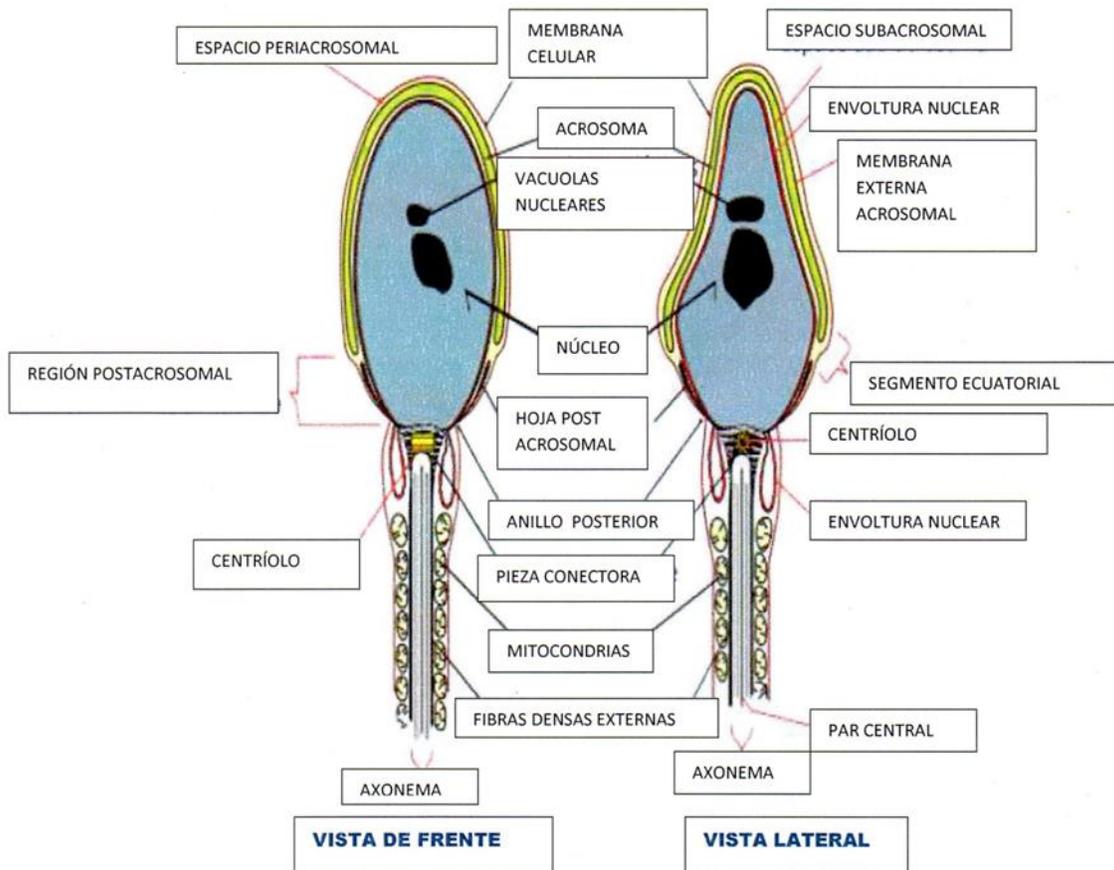


FIG.9 Estructura del espermatozoide por Mariana Ruíz. (2) adaptado de Knobil y Neill., 1999.

6.1 El espermatozoide equino

EL espermatozoide del semental mide $60\mu\text{m}$ de largo y $2,7\mu\text{m}$ de ancho. El espermatozoide equino permanece como mínimo 4 días en el epidídimo. (Amman y Graham., 2011). La formación del espermatozoide equino en el testículo dura 57 días (Senger, 2005).

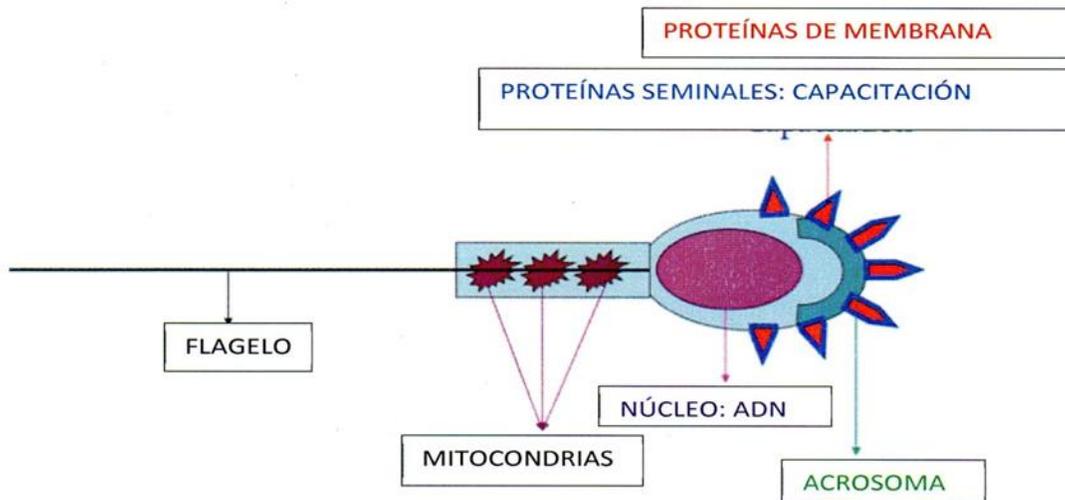


FIG.10 Espermátide o espermatozide adaptado de Ponthier *et al.*, 2014

6.2 Capacitación del espermatozoide

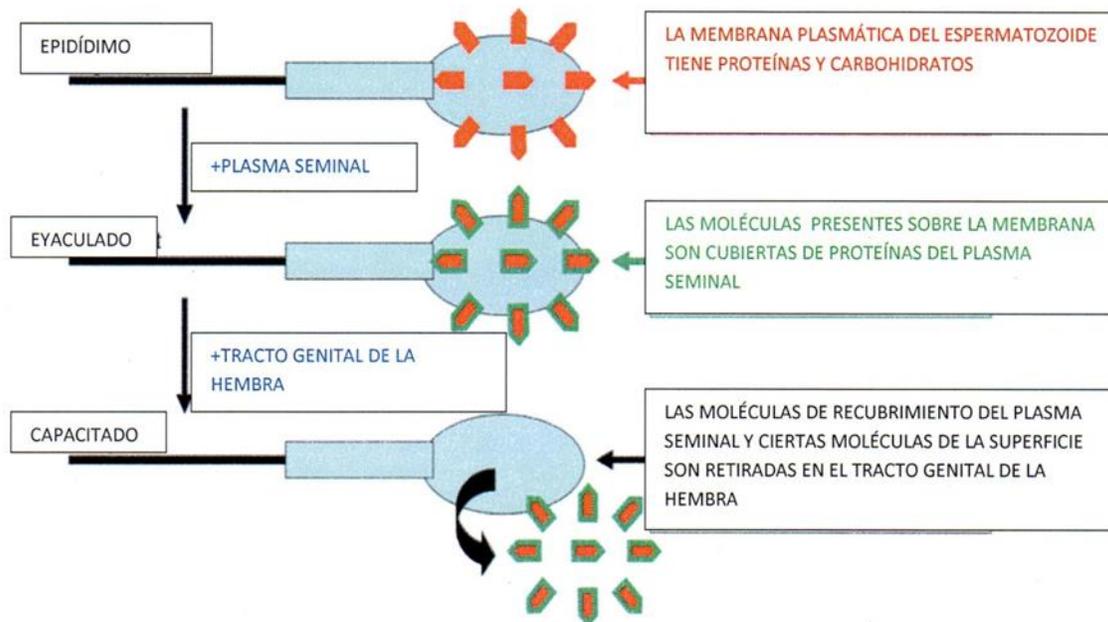


FIG.11 Capacitación del espermatozide adaptado de Ponthier *et al.*, 2014.

6.3 Morfología del espermatozoide equino

En el semental la proporción de espermatozoides anormales debe de ser inferior a 35%. Las anomalías primarias como las de la cabeza o las de la pieza media son el resultado de una disfunción en la espermiogénesis mientras que las anomalías secundarias como las de la cola o las gotas citoplasmáticas distales son resultado de errores en la colección como colecciones repetidas provocando la aparición de gotas citoplasmáticas distales por falta de maduración epididimaria o por errores de conservación del semen como choque térmico (Amman y Graham, 2011; Pickett ,1993).

1) Clasificación morfológica de la cabeza (Espermatozoides observados con el microscopio de contraste de fase con 1000 aumentos)



FIG.12 Clasificación morfológica de la cabeza: Defectos de conformación de la cabeza. (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham, 1993)

Existe una gran variación en las formas normales de las cabezas de los espermatozoides de los sementales.

(a, j) Comparación entre varias cabezas de espermatozoides equinos consideradas normales para su clasificación.

(k, l) Cabezas piriformes o de bases estrechas de espermatozoides equinos.

(m, n) Los asteriscos indican cabezas piriformes.

(o, q) Las cabezas microcefálicas pueden tener formas normales.

(r, s) Cabezas redondas.

(t, v) Cabezas ahusadas o que terminan en punta.

(w, x) Cabezas de formas anormales.

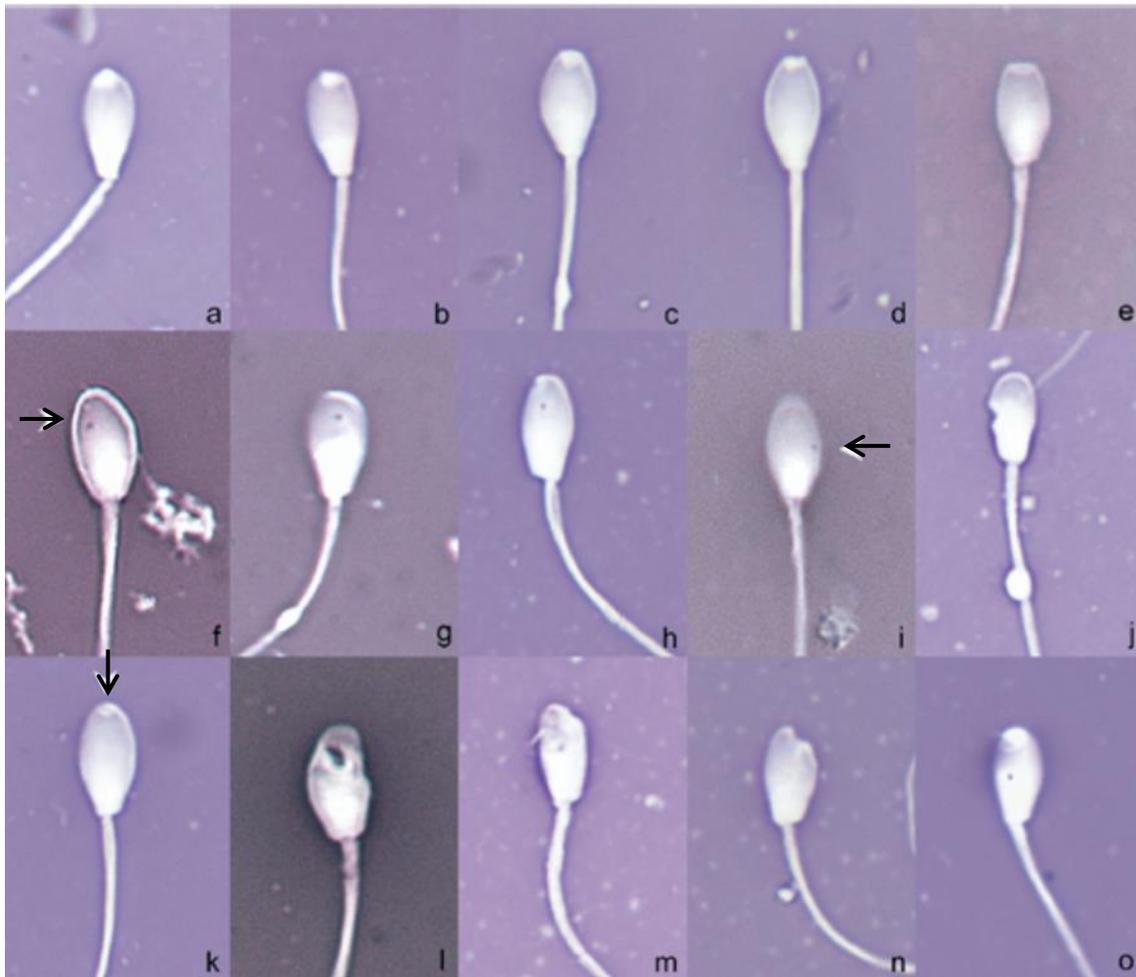


FIG.13 Clasificación morfológica de la cabeza: Defectos del acrosoma.
(Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

El defecto mas común del acrosoma es el acrosoma en forma de copete, en el cual su apariencia varia de la forma de un gránulo que se engrosa en el ápice de la cabeza del espermatozoide sobresaliendo de la cresta de la cabeza (a-c) a una forma de abolladura o muesca (d) y aplanando el ápice. (e) Vacuolas nucleares

aparecen como puntos oscuros y se pueden observar en cualquier parte de la cabeza

(i-f las flechas los señalan). Las vacuolas son abultadas y causan la deformidad de la cabeza (j, l-n). Las vacuolas localizadas en el ápice de la cabeza envuelven anomalías del acrosoma (k-n la flecha señala la vacuola en k), algunas veces estos defectos se observan comúnmente.

2) Morfología de la cola



FIG.14 Morfología de la cola.(1) (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

El reflejo distal de la pieza media es un defecto común que aparece como un encorvamiento en la región distal de la pieza media en la figura de la letra j, usualmente con la gota citoplasmática distal atrapada en el encorvamiento (a, b). Encorvamientos dobles o el enroscado de la pieza media usualmente se acompañan del enroscado de la pieza principal con retención de material citoplásmico (c-e). El defecto de borde festoneado también envuelve al encorvamiento y /o al enroscado de la pieza media o de la cola entera pero se asocia con la áspera e incompleta lamina mitocondrial y de las fracturas y de los aplastamientos de las fibras del axonema (f, j). Simples encorvamientos o enroscados con retención citoplasmática (l,m), y menos común aplasia (n), o desarrollo anormal (o) son algunos de los defectos que envuelven únicamente a la pieza principal.



FIG.15 Morfología de la cola. (2) (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

Aplasia segmental de la lamina de la mitocondria; se puede observar en varios grados en pequeños segmentos en algunos de los espermatozoides (flecha en la letra a) hacia la completa carencia aparente de la mitocondria en otros espermatozoides (b).

Aplasia segmental de las laminas de la mitocondria; crea puntos estructurales débiles que predisponen a fracturas (c-e). Piezas medias hinchadas y asperas envuelven anomalías de la lámina de la mitocondria; o acumulación de masas microtubulares. La alteración de la pieza media y la protuberancia de las fibras del axonema se observan ocasionalmente (i, j)

Gotas citoplasmáticas aparecen en pequeñas masas esféricas adjuntas a la región del cuello (letra k gota próximal) o a la porción distal de la pieza media adyacente al anillo (letra n gota distal). La localización, el tamaño y el contorno de las gotas citoplasmáticas diferencia los otros defectos de la pieza media, como seudogotas, residuos citoplasmáticos (l) y defectos de las masas microtubulares (posible defecto representado en la letra m en la hinchazón proximal en la letra o.)

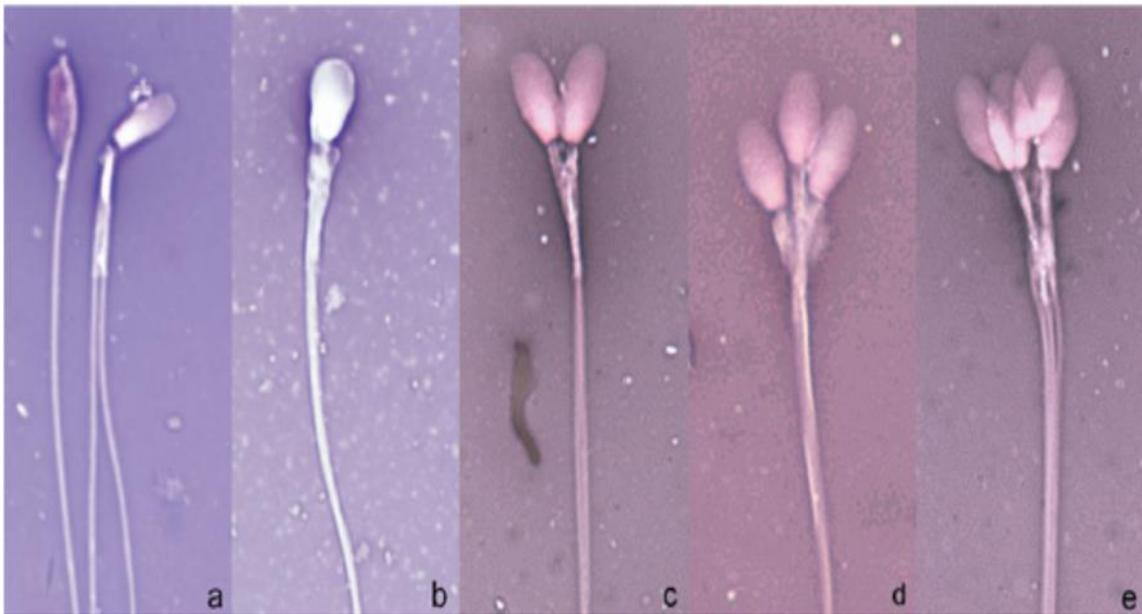


FIG.16 Duplicación de cabezas y de colas. (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

(a,b) Duplicación de la cola.

(c,e) Múltiples cabezas y colas.

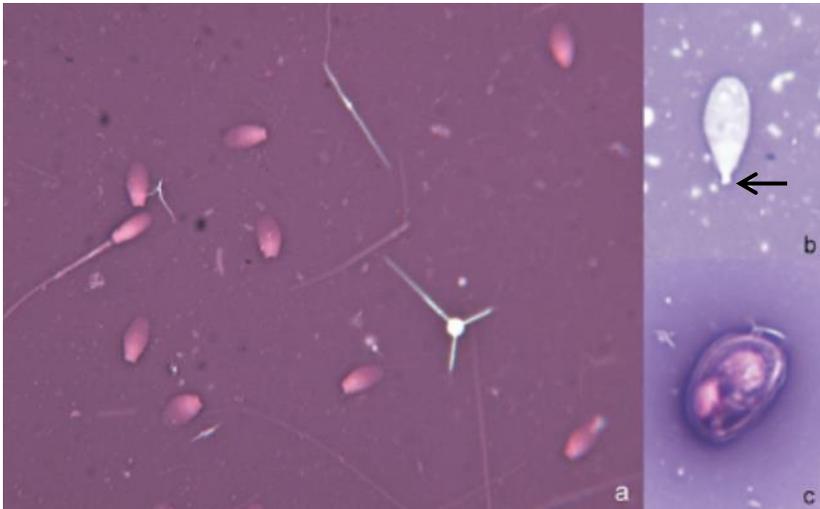


FIG.17 Cabezas sueltas. (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

- a) Cuando existe una gran acumulación de espermatozoides es común observar cabezas sueltas teñidas.
- b) Un examen cauteloso debe hacerse del aparente desprendimiento de la cabeza, debe presentar un muñón en la cola del espermatozoide. La cabeza con la flecha muestra una cabeza suelta con el muñón de la cola.
- c) Teratoides de espermatozoide son células severamente deformadas, apenas se reconocen como espermatozoides, no hay que confundirlos con desechos u otras células.

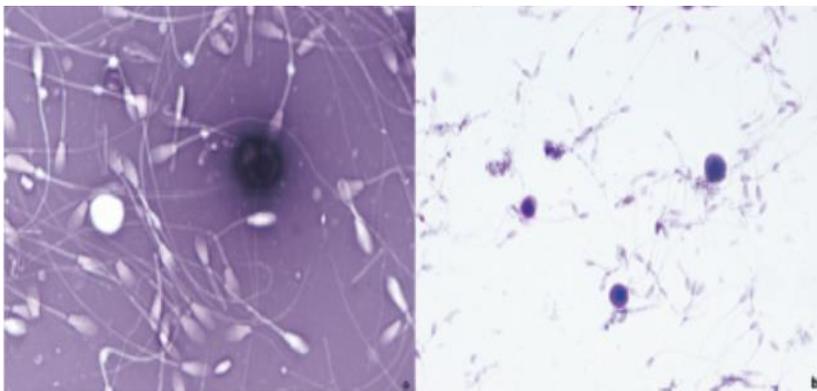


FIG.18 Membranas intactas. (Tinción Eosina/Nigrosina) (Amann y Graham., 1993)

- a) Con la tinción de Eosina/ Negrosina se pueden observar las membranas intactas de las cabezas de los espermatozoides y se ven de color blanco. Estos espermatozoides están vivos al momento de hacer la tinción. Y los que tienen coloración son porque sus membranas están dañadas y están muertos al momento de la tinción.
- b) Para diferenciar estas células de leucocitos se necesita usar tinciones para sangre como Diff Quik

6.4 Motilidad del espermatozoide

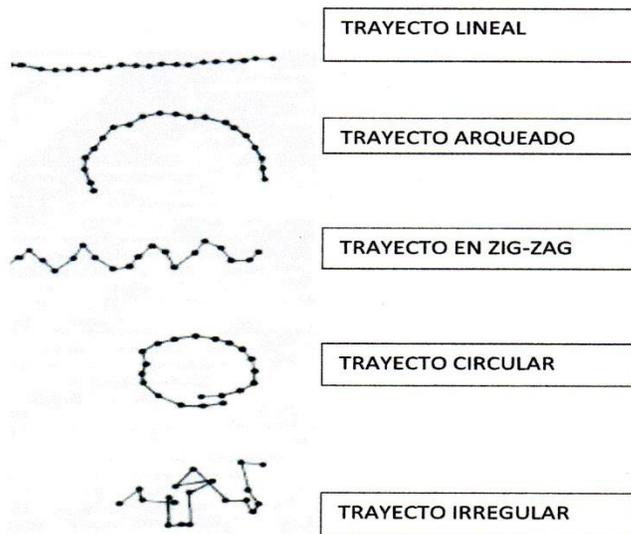


FIG.19 Trayectorias del espermatozoide equino tomado de Varner *et al.*, 2008.

El caballo presenta un tipo de movimiento espermático circular o semicircular muy característico debido principalmente a la inserción abaxial de la pieza intermedia en la cabeza del espermatozoide, que en otras especies no se catalogaría como progresivo (Samper, 2009).

7.- ALGUNAS ANOMALIAS REPRODUCTIVAS QUE AFECTAN LA FERTILIDAD EN EL EQUINO

- Vesiculitis seminal.- no es común en los sementales pero por su persistencia puede interferir en la fertilidad. Puede ser causada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* y *Brucella abortus*.
- Hemospermia.- Hemospermia asociada a defectos uretrales.
- Disfunción acrosomal.- se deben hacer varias pruebas: analizar los espermatozoides, la estructura de la cromatina, la reacción acrosomal y si hay anticuerpos contra el semen. Los sementales subfértiles presentan un alto porcentaje de anticuerpos. En los humanos que presentan infertilidad existe un alto porcentaje de anticuerpos contra el semen. Se demostró que el alto porcentaje de anticuerpos interfiere con la inducción de la reacción acrosomal por la zona pelúcida (Varner *et al.*, 2000).
- Cromatina anormal.- en los sementales puede deberse a un golpe en los testículos que produzca acumulación de líquidos que suban su temperatura y causen cambios en la motilidad, la morfología y en la estructura de la cromatina.
- Azoospermia.- ausencia total de espermatozoides en el eyaculado, que puede ser causada por falla espermática, obstrucción de los conductos deferentes, por eyaculación retrograda. También por una hipoplasia testicular severa o degeneración testicular generada por una falla de la producción espermática del

epitelio seminífero, por una obstrucción del epidídimo o de los conductos deferentes (Varner *et al.*, 2000).

VIII ORIGENES DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

A) LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es indispensable para los seres vivos. La mayor parte de la energía del caballo es producida por la reacción enzimática controlada, de la molécula de oxígeno con el átomo de hidrógeno durante la fosforilación oxidativa que se realiza en la cadena respiratoria mitocondrial. La energía producida se conserva bajo la forma de trifosfato de adenosina (ATP). Este proceso mitocondrial no es perfecto, 2 a 5% del oxígeno se transforma en especies reactivas de oxígeno (ROS). (Cadenas y Davies, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son especies químicas oxigenadas variadas, comprendiendo los radicales libres, los iones oxigenados y los peróxidos. Los radicales libres son especies químicas que tienen uno o varios electrones libres en su capa externa. Estos electrones no apareados son capaces de reaccionar de manera independiente con los átomos y las moléculas. La presencia de un electrón libre confiere a estas moléculas una gran inestabilidad, lo que les da la posibilidad de reaccionar con numerosos compuestos en procesos no específicos y donde su duración de vida es muy corta (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los principales radicales libres celulares son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), los radicales peróxilos (ROO^{\cdot}), y alcoxilos (RO^{\cdot}), donde R representa una cadena carbonada. Otros radicales libres son derivados de moléculas de oxígeno y de nitrógeno como el monóxido de nitrógeno (NO^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Los iones oxigenados como el ion hipoclorito (ClO^{\cdot}), y los peróxidos (de fórmula $ROOR'$) constituyen los precursores de estos radicales libres (Favier, 2003). Concerniendo a los peróxidos la escisión homolítica de la relación O-O conlleva la formación de radicales libres. Los principales peróxidos celulares son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los peróxidos lipídicos y el nitro-peróxido ($ONOOH$). Por otra parte se distinguen los radicales primarios, el anión superóxido y el monóxido de nitrógeno ($O_2^{\cdot-}$ y el NO^{\cdot}), los radicales secundarios producidos en cascada a partir de los radicales primarios.

Los orígenes celulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son esencialmente enzimáticos. Uno es la pérdida de electrones al nivel de los complejos enzimáticos de la cadena mitocondrial y la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidasa, localizada en la membrana plasmática de las células. Otros orígenes citosólicos, presentes en diversos organelos celulares, pueden desempeñar un papel en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Como la xantina oxidasa (XO), las enzimas del retículo endoplásmico liso (citocromo P450), la NO sintasa (NOS), la mieloperoxidasa (MPO) y las enzimas de la vía del ácido araquidónico (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Algunos de estos ROS como el anión superóxido o el monóxido de nitrógeno son poco reactivos y tienen un papel de mediadores, regulando las funciones biológicas celulares. Otros ROS como por ejemplo el radical hidroxilo son muy reactivos con la mayor parte de las moléculas biológicas como los lípidos, los ácidos nucleicos, las proteínas y los glúcidos induciendo daños oxidantes (Saleh y Agarwal, 2002). Sin embargo todos estos ROS también tienen papeles fisiológicos como la destrucción de bacterias en las células fagocitarias o la regulación de la apoptosis. La producción de los ROS debe de estar controlada. El organismo está dotado de un conjunto de sistemas de defensa muy eficaces contra la sobreproducción de los ROS.

Las células utilizan varias estrategias antioxidantes y consumen mucha energía para controlar su nivel de ROS. El mecanismo de estos sistemas antioxidantes difiere según los tejidos y los tipos celulares y también según donde se encuentren, en medio extracelular o intracelular (Bonafant-Rousselot *et al.*, 2003). También hay sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX). Los principales antioxidantes no enzimáticos son la vitamina E o α -tocoferol, la vitamina C o ácido ascórbico, la glutatión reducida (GSH) y el ácido úrico (Kirschvink *et al.*, 2008).

El **estrés oxidante** se define como un desequilibrio de la balanza entre los sistemas de defensas antioxidantes y la producción de los ROS en favor de estos últimos.

Este desequilibrio puede tener diferentes orígenes:

- La producción excesiva endógena de los ROS por las células como por ejemplo de origen inflamatorio.
- Una disminución de la protección antioxidante celular como por ejemplo vía un déficit nutricional en antioxidantes.
- Una exposición del entorno a factores pro-oxidantes como por ejemplo los medicamentos, los rayos gamma y ultravioletas, los herbicidas o los metales tóxicos (Favier, 1997).

La aparición de un estrés oxidante en las células es el origen de los daños oxidantes de las moléculas celulares.

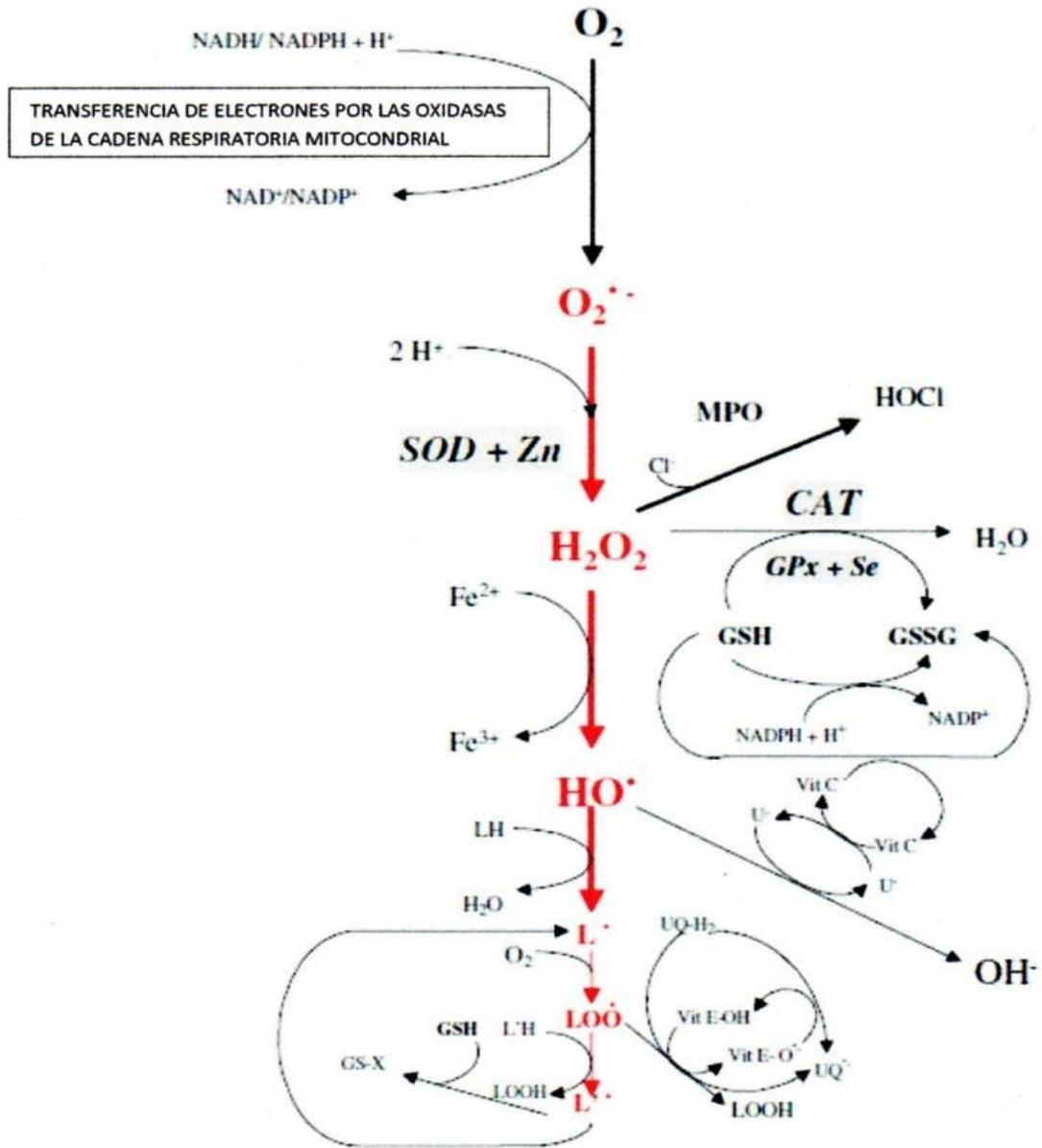


FIG.20 Principales vías oxidantes celulares y sistemas antioxidantes que transforman o inactivan a las especies reactivas de oxígeno tomado de Kirschvink *et al.*, 2008.

O_2 , oxígeno; $O_2^{\bullet-}$, anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; HO^{\bullet} , radical hidroxilo; LH, lípido; L^{\bullet} , radical lipídico; LOO^{\bullet} , lípido peróxido; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPx, glutatión peróxido; MPO, mieloperoxidasa; GSH, glutatión reducido, GSSG, glutatión oxidado; GS-X, glutatión ligado a un oxidante; NADPH, nicotinamida adenina fosfato; U, ácido úrico; Vit C, vitamina C; Vit E, vitamina E; UQ, ubiquinona.(paso de electrones por las oxidasas de la cadena respiratoria mitocondrial).

B) FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA FUNCIONALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES EQUINOS

Los espermatozoides son vulnerables al ataque oxidativo por que contienen en abundancia ácidos grasos poliinsaturados que son susceptibles a la peroxidación de los lípidos (Aitken *et al.*, 2014).

Las proteínas y el ADN están sujetos a la oxidación y a la aducción de aldehídos: 4HNE (4 hidroxí-2-nonenal) que generan la peroxidación. Las proteínas aducidas por 4HNE (4hidroxí-2-nonenal) incluyen elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como la deshidrogenasa del ácido succínico.

El ataque electrófilico estimula los ROS mitocondriales y ocurre la peroxidación de los lípidos. En última instancia se desencadena la vía apoptótica intrínseca provocando la pérdida de motilidad y la muerte celular (Aitken *et al.*, 2014).

Durante la apoptosis espermática, los ROS (especies reactivas de oxígeno) acceden al núcleo y generan aductos de base de oxidación : 8 hidroxí 2 desoxigenasa (8-OH-dG), que se convierten en sitios abásicos por glicosilasa8oxigenasa (OGG1), la única enzima de la vía de reparación por escisión de base poseída por los espermatozoides. Estos sitios abásicos posteriormente se convertiran en el origen de la fragmentación (Aitken *et al.*, 2014).

Los ROS (especies reactivas de oxígeno) tienen un papel importante en la fisiología de la maduración de los espermatozoides de mamíferos, en la discapacidad de fertilización del macho, en la alteración de la integridad del ADN, en la línea germinal del macho y en el daño iatrogénico inducido por los procedimientos de preparación y para la crioconservación (Aitken *et al.*, 2014).

Los tres posibles orígenes de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en espermatozoides de mamíferos son:

- la NADPH oxidasa bajo la forma de-NOX5 que genera superóxido (NADPH, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida) (Aitken *et al.*, 2014).
- La mitocondria espermática (Koppers *et al.*, 2008).
- Aromatico.t amino ácido oxidasa (Tosic y Walton., 1950).

EL hecho de que el DPI (Flavoproteína inhibidor difenileno) pueda suprimir efectivamente la producción de los ROS en los espermatozoides del caballo, ratón, búfalo y hombre (Aitken *et al.*, 2014). Ha sido citado frecuentemente como evidencia y que la NADPH oxidasa constituye una mayor fuente de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en estas células. También el DPI puede suprimir la generación de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en la mitocondria (Li y Trush., 1998).

La vulnerabilidad de los espermatozoides a los ataques oxidativos se debe a su estructura anatómica y a su composición bioquímica (Aitken *et al.*, 2014).

El espermatozoide está provisto de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa e isoformas de peroxiredoxin que se encuentran en la pieza media e interceptan a los radicales libres generados por la mitocondria (Aitken *et al.*, 2014).

También los espermatozoides son propensos a los ataques oxidativos por contener ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática: ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico. Estos ácidos grasos dan fluidez a la membrana plasmática, promueven las enzimas claves como las ATPasa de la membrana plasmática y para facilitar la fusión de la membrana en la fertilización.

Los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática no son los únicos blancos de los ataques de los radicales libres durante el estrés oxidativo, también el DNA en el núcleo (Aitken *et al.*, 2014).

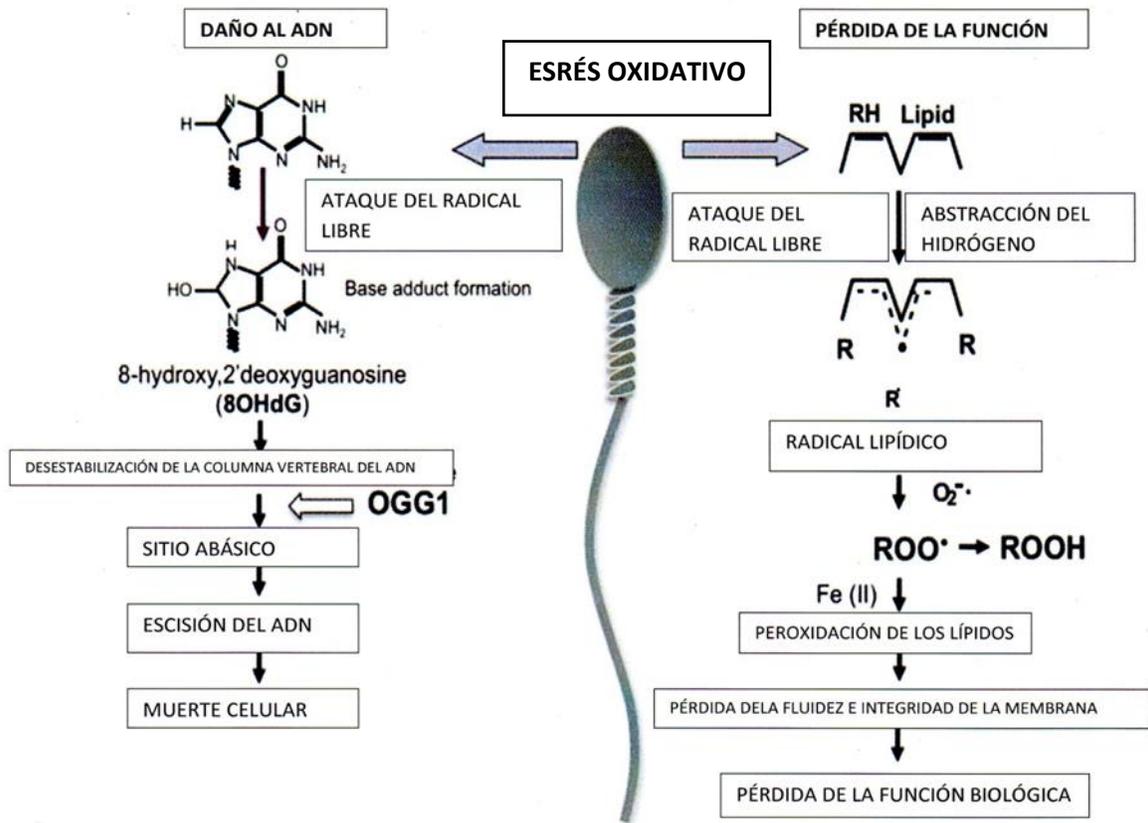


FIG.21 Estrés oxidativo tomado de Aitken *et al.*, 2014.

Se muestra el impacto negativo del estrés oxidativo en los espermatozoides de mamíferos. Cuando la generación celular de los ROS sobrepasa la habilidad del espermatozoide para defenderse, se establece el estado del estrés oxidativo.

Si la cromatina del espermatozoide tiene pocas protaminas, entonces el ADN es vulnerable al ataque oxidativo dando como resultado la formación de aductos de base como el 8-hidroxi 20-deoxiguanosina. La formación de este aducto activa la reacción de la oxoguanina glicosilasa (OGG1) que corta la base modificada, sacándola del esqueleto del ADN, creando un sitio abásico en el proceso, el cual forma el ultimo sitio de escisión del ADN. El lado derecho de la ecuación ilustra la habilidad del estrés oxidativo para provocar la peroxidación de los lípidos que conlleva a la pérdida de la función del espermatozoide. Esta vía es catalizada por la

presencia de metales como el Fe (II), y por las especies reactivas de oxígeno (Aitken *et al.*, 2014).

1.- ACTIVIDAD FISIOLÓGICA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

1.1 Fosforilación de la tirosina

La principal función fisiológica de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en los espermatozoides es la regulación de la fosforilación de la tirosina en la cola del espermatozoide (Aitken *et al.*, 2014).

El conductor de la capacitación es el cAMP (adenosina monofosfato cíclico).

1.2 Remoción del Colesterol durante la capacitación

Otro cambio bioquímico asociado con la capacitación espermática es la pérdida de colesterol de la membrana plasmática espermática. (Davis, 1981).

El colesterol y el desmosterol son removidos de la superficie espermática por los aceptores proteínicos como la albumina, lipoproteínas de alta densidad y apolipoproteínas.

El colesterol es un poderoso factor descapacitante que sirve para estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide durante su paso por el epidídimo y previene las interacciones intermoleculares responsables de llevar a cabo la capacitación (Davis, 1981).

Los esteroides son oxidados durante la capacitación y el incremento de la hidrofilia de los productos de la oxidación, facilita su transformación a albumina (Brouwers *et al.*, 2011).

1.3 Sincronizando la conducción de la óxido reducción (REDOX) para la capacitación

Una de las razones por las cuales los espermatozoides son almacenados en un estado quiescente en la región de las trompas de Falopio en humanos a medio camino de la concepción es que deben medir el tiempo del inicio de la impulsión óxidoreductiva para que coincidan con la fosforilación de la tirosina y la movilidad hiperactivada para coincidir con la ovulación. Si capacitan muy rápido entran en estrés oxidativo (Vignini, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011).

El anión peroxinitrito estimula la capacitación espermática a causa de su fuerte actividad oxidativa, puede consumir fácilmente los grupos tioles libres de los espermatozoides tales como el glutatión e interrumpir la actividad de la membrana, expresando las enzimas tioles incluyendo las actividades de Na⁺/K⁺-ATPasa y Ca²⁺-ATPasa de las cuales depende de la supervivencia del esperma. La última consecuencia de la óxido reducción (redox) para la capacitación es iniciar la apoptosis en estas células. (Vignini, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011).

El acto de la fertilización por lo tanto rescata ambos gametos de un fallecimiento apoptótico. En ausencia de la fertilización, los espermatozoides y los ovocitos llegan a ser en última instancia apoptóticos, y, en ambos gametos, el primer signo de que este camino ha empezado es la aceleración de la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) mitocondriales. (Lord *et al.*, 2013).

En términos de sobrevivencia el regulador central de la viabilidad espermática es el camino de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K)-AKT1. En espermatozoides el regulador negativo del sistema, la fosfatasa y el homólogo tensin PTEN están físicamente localizados en un compartimiento diferente de la célula de PI3K, permitiendo que estos últimos sean activos (Koppers *et al.*, 2011). Las hormonas tales como la prolactina y la insulina promueven la supervivencia del espermatozoides aumentando la actividad de los pares de PI3K-AKT (Aitken *et al.*, 2013; Pujianto *et al.*, 2010). La activación del receptor proliferador-activado peroxisoma (PPAR) con rosiglitazona pueden estimular la fosforilación AKT1 y aumentar la supervivencia del semen (Aquila *et al.*, 2006).

Los espermatozoides del semental producen cantidades copiosas de especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno incluyendo el óxido nítrico, el anión del superóxido, y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno). (Sabeur y Ball., 2006; Morillo *et al.*, 2009). La producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) es influenciada por la estación donde la producción de superóxidos es más alta en el principio del periodo de reproducción que al final de la misma (Morrell *et al.*, 2013).

La aparente susceptibilidad de los espermatozoides equinos al estrés oxidativo estimula el interés de usar antioxidantes para contrarrestar estos procesos para ayudar a la fertilidad *in vivo* e *in vitro*. Los espermatozoides de mamíferos son células activas óxidoreductoras. Los espermatozoides humanos son capaces de producir los ROS *in vitro* pero sobre todo producen el anión superóxido (O₂^{•-}) que después se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Aitken, 1995). Igual los espermatozoides equinos separados por centrifugación del plasma seminal producen los ROS *in vitro* en condiciones aerobias (Ball *et al.*, 2001a), también producen el anión superóxido (Sabeur y Ball, 2006; Burnaugh *et al.*, 2007). Las mitocondrias espermáticas, también producen los ROS (especies reactivas de oxígeno). El papel principal de las mitocondrias es producir energía bajo la forma trifosfato de adenosina (ATP) utilizando el oxígeno como sustrato. (Peña *et al.*, 2009), En los espermatozoides la concentración del anión superóxido es 5 a 10 veces más importante en la matriz mitocondrial que en el citosol o en el núcleo (Cadenas y Davies, 2000).

2.- EL ESTRÉS OXIDANTE EN LA CRIOPRESERVACIÓN

La crioconservación del semen provoca un estrés oxidante ocasionado por una producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y una degradación de los antioxidantes (Baumber *et al.*, 2003; Mazzilli *et al.*, 1995).

Este estrés induce una alteración de la membrana plasmática por lipoperoxidación, y fragmentación del ADN. La fragmentación del ADN aumenta con el número de ciclos de congelación y descongelación (Linfor y Meyers, 2002).

La eliminación del plasma seminal previo a la congelación disminuye la capacidad del semen para eliminar los ROS (especies reactivas de oxígeno) (Ball *et al.*, 2001).

C) AFECTACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES EQUINOS POR EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y POR EL ESTRÉS OXIDANTE

Existe un equilibrio entre la producción, la destrucción o la inactivación de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en el aparato reproductor del macho y en el plasma seminal después de la eyacuación del semen. En consecuencia solo una pequeña cantidad de los ROS (especies reactivas de oxígeno) está presente, permitiendo la regulación de la función espermática. Sin embargo una producción excesiva de los ROS o una disminución de la protección antioxidante puede ser el origen de un desequilibrio en favor de los ROS (especies reactivas de oxígeno). Este desequilibrio provoca un estrés oxidante. Todos los componentes celulares como los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos, los glúcidos son blancos potenciales para este estrés oxidante. Los daños causados por el estrés oxidante no solo depende de la naturaleza y la cantidad de los ROS (especies reactivas de oxígeno) implicados sino también del momento, de la duración de la exposición de los ROS (especies reactivas de oxígeno), de los factores externos como la temperatura, la presión parcial del oxígeno y la composición del entorno en iones, proteínas y los sistemas antioxidantes (Saleh y Agarwal, 2002).

1.- AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN EL SEMEN EQUINO

1.1 Producción excesiva de ROS por los espermatozoides anormales e inmaduros.

Los espermatozoides equinos con morfología anormal producen grandes cantidades de ROS (especies reactivas de oxígeno). Cuando se hace una separación de espermatozoides por gradientes de silicato se distinguen dos poblaciones. La población de baja densidad caracterizada por una producción más importante de peróxido de hidrógeno H_2O_2 con respecto a la población de alta densidad (Ball *et al.*, 2001a). Estos datos son los mismos obtenidos en varios estudios efectuados en espermatozoides humanos (Aitken *et al.*, 1992; Barroso *et al.*, 2000).

In vitro la capacidad de los espermatozoides para producir los ROS (especies reactivas de oxígeno) es inversamente correlacionada a su estado de maduración. Una de las causas de producción excesiva de los ROS por los espermatozoides

humanos de morfología anormal es la persistencia del citoplasma residual en la pieza media de los espermatozoides maduros (Aitken y Krauss, 2001). La pérdida del citoplasma se efectúa normalmente durante la espermiogénesis. La presencia del citoplasma residual se debe a un mal funcionamiento de las células de Sertoli. Estas células fagocitan una gran parte del citoplasma de los espermatozoides en el momento de la espermiación cuando estos son liberados en la luz de los tubos seminíferos (Aitken y Krauss, 2001).

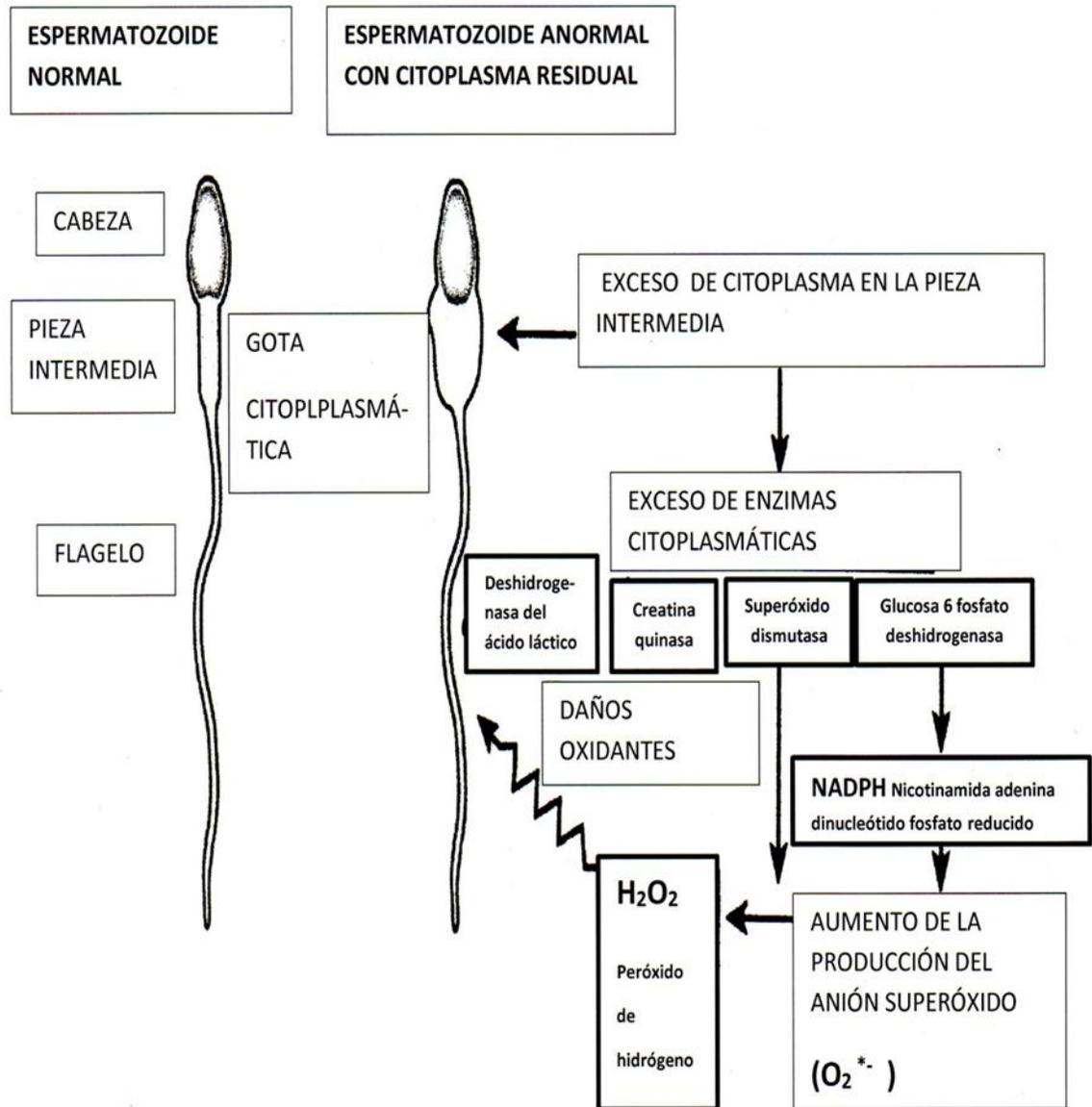
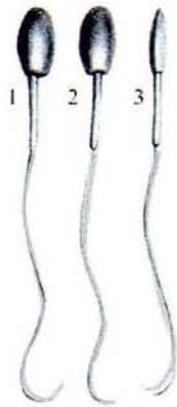
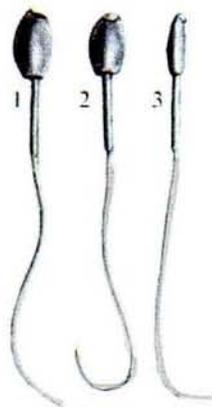


FIG.22 Mecanismos de la producción excesiva de las especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides humanos, presentando una retención del citoplasma tomado de Saleh y Agarwal, 2002.

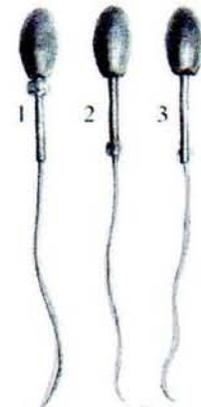
La alta producción de los ROS está asociada al porcentaje de espermatozoides con anomalías de la cabeza, daños en el acrosoma, defectos de la pieza media y de la cola.



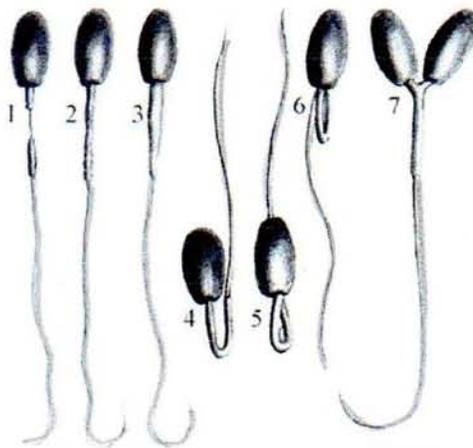
ESPERMATOZOIDES DE MORFOLOGÍA NORMAL



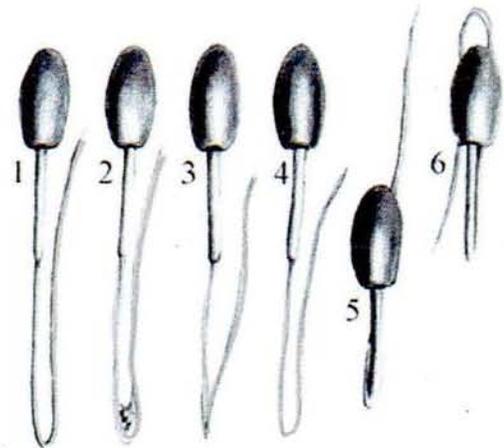
DEFECTOS DEL ACROSOMA



GOTAS CITOPASMÁTICAS: PROXIMALES (1) Y DISTALES (2.3)



ANOMALÍAS DE LA PIEZA INTERMEDIA
 (1) APLASIA SEGMENTARIA DE LA ENVOLTURA FIBROSA MITOCONDRIAL; (2) PIEZA INTERMEDIA IRREGULAR CAUSADA POR UNA DISTRIBUCIÓN DESIGUAL DE LAS MITOCONDRIAS; (4, 5, 6) PIEZA INTERMEDIA DOBLADA; (7) DOBLE PIEZA INTERMEDIA Y DOBLE CABEZA.



ANOMALÍAS DE LA COLA:
 CURVATURAS DE LA COLA A DIFERENTES NIVELES.

FIG.23 Morfología normal y anormal de los espermatozoides asociada al aumento de la producción de los ROS tomado de Varner, 2008.

Los espermatozoides están muy compactados en los tubos seminíferos y en el epidídimo, es posible que la coexistencia de los espermatozoides de morfología anormal que producen altos niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno), con los espermatozoides maduros, durante la migración de los tubos seminíferos hacia al epidídimo, podrían estar implicados en los daños oxidantes de los espermatozoides maduros (Guerin *et al.*, 1989).

1.2 Producción excesiva de ROS (especies reactivas de oxígeno) por los espermatozoides, por actividad mitocondrial aberrante y una riqueza inhabitual en ácidos grasos poli-insaturados.

La disminución del potencial eléctrico membranario mitocondrial o la perturbación del flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones es el origen de un aumento de la producción mitocondrial de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en los espermatozoides humanos (Koopers *et al.*, 2010).

Los espermatozoides humanos (De Lamirande *et al.*, 1997) y los de las ratas (Lewis y Aitken, 2001) que tienen un débil poder fecundante son más ricos en ciertos ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, el ácido docosahexaenoico y el ácido linoleico. Esta riqueza en ácidos grasos poliinsaturados caracteriza un estado de inmadurez de estos espermatozoides porque su cantidad disminuye, fisiológicamente durante el remodelaje funcional de la membrana plasmática espermática, durante su paso por el epidídimo (Aitken *et al.*, 2014, Lewis y Aitken, 2001). La incubación de los espermatozoides humanos con el ácido araquidónico estimula la producción espermática de los ROS (especies reactivas de oxígeno) (Aitken *et al.*, 2006). Este aumento de la producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) no parece implicar el NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) oxidasa membranaria ya que el aumento de un inhibidor de la NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) oxidasa de los monocitos estimula la producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) espermáticos (Aitken *et al.*, 2006). Sin embargo el ácido araquidónico disminuye el potencial eléctrico membranario mitocondrial y promueve la producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) por las mitocondrias de las células cardiacas de bovinos interfiriendo con el flujo de electrones en los complejos I y III (Cocco *et al.*, 1999; Koopers *et al.*, 2008) entonces se emitió la hipótesis que la presencia de fuertes porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados en los espermatozoides humanos promueve la producción mitocondrial de los ROS (especies reactivas de oxígeno) por los complejos I y III que rebasan los límites de las capacidades antioxidantes de los espermatozoides.

1.3 Producción excesiva de ROS por los leucocitos que contaminan el semen

Los leucocitos cuando son activados por ciertos estímulos, como los factores de la inflamación son capaces de producir cantidades importantes de ROS (especies reactivas de oxígeno). Estos ROS (especies reactivas de oxígeno) son producidos

durante la fagocitosis por el intermediario de 3 enzimas: la NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido) oxidasa, la mieloperoxidasa (MPO) y el NO sintasa. En el hombre los leucocitos parecen contribuir al estrés oxidante en el semen cuando hay epididimitis o inflamación crónica del tracto genital masculino. No se ha realizado un estudio sobre la contaminación de leucocitos en el semen equino. Aunque se haya demostrado *in vitro* la capacidad de los leucocitos a producir ROS (especies reactivas de oxígeno) en el semen equino (Plante *et al.*, 1994; Aitken *et al.*, 1995).

2.- EFECTOS NEGATIVOS DEL ESTRÉS OXIDANTE EN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL

Los espermatozoides son células particularmente sensibles a los ROS (especies reactivas de oxígeno) por:

- La riqueza de su membrana plasmática rica en ácidos grasos poliinsaturados y al ataque de los dobles enlaces carbono-carbono por los ROS (especies reactivas de oxígeno) (Jones *et al.*, 1979).
- El volumen limitado de su citoplasma y su localización restringida que es responsable de una baja disponibilidad de las moléculas antioxidantes y de las enzimas que reparan los daños oxidantes.

Los efectos negativos de los ROS (especies reactivas de oxígeno) sobre los espermatozoides son:

- La disminución del número de espermatozoides en el semen.
- La peroxidación de los lípidos membranares.
- La disminución de la motilidad.
- La oxidación del ADN.
- La activación de la apoptosis.

La disminución del número de espermatozoides en los eyaculados que tienen altos porcentajes de ROS (especies reactivas de oxígeno) ha sido comprobada en los humanos. Esta disminución puede ser la consecuencia de los daños oxidativos en los tubos seminíferos provocando una atrofia testicular y una disminución de la producción de los espermatozoides. (Baumer *et al.*, 2000; De Lamirande y Gagnon, 1992 a, b; Armstrong *et al.*, 1999).

La implicación de los ROS (especies reactivas de oxígeno) en la peroxidación de los lípidos membranares ha sido comprobada *in vitro* en el semental. La peroxidación de los lípidos membranares corresponde al ataque oxidante de los ácidos grasos poliinsaturados, iniciado por el radical hidroxilo. La peroxidación tiene por consecuencia una alteración de la función de las membranas espermáticas: disminución de la fluidez, pérdida de la integridad, alteración de la estructura de ciertas proteínas. Esta alteración afecta la capacidad fecundante del espermatozoide por la disminución de la motilidad, una disminución de la fusión ovocito-espermatozoide, una pérdida energética bajo la forma de adenosina trifosfato (ATP), un defecto de reconocimiento y de penetración de la zona pelúcida. Además, los productos finales de la peroxidación de los lípidos

membranarios, sobretodo los radicales peroxilos y alcoxilos son altamente citotóxicos y pueden causar daños oxidantes sobre las proteínas y en el ADN (Jones *et al.*, 1979; Baumer *et al.*, 2000).

El marcador de peroxidación lipídica membranaria más utilizado en los espermatozoides equinos es la determinación del porcentaje de dialdehído malónico o malondialdehído, compuesto final de la peroxidación de los lípidos membranarios en los espermatozoides o en el plasma seminal (Tremellen, 2008). Otro marcador que se usa en humanos y en equinos en la peroxidación lipídica membranaria es el BODIPY C11 (Ball y Vo, 2002; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009).

Los ROS (especies reactivas de oxígeno) son probablemente también responsables *in vitro* en la disminución de la motilidad de los espermatozoides equinos. Existen dos hipótesis:

- la pérdida de la motilidad es una consecuencia de la peroxidación de los lípidos por pérdida de fluidez y de integridad de la membrana, induciendo a una pérdida de la capacidad para regular las concentraciones intracelulares de calcio.
- la inhibición de las enzimas de la glicólisis por la oxidación de los grupos sulfidrilos por los ROS (especies reactivas de oxígeno), teniendo por consecuencia una disminución de la producción de los ATP (Adenosina trifosfato) (Baumer *et al.*, 2000).

3.- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA OXIDACIÓN DEL ADN

La oxidación del ADN implica a los productos de los ROS (especies reactivas de oxígeno), producidos por los mismos espermatozoides (Henkel *et al.*, 2005).

La capacidad de los ROS (especies reactivas de oxígeno) para fragmentar el ADN de los espermatozoides equinos se inhibe en un medio de incubación de catalasa (CA) y de glutatión peroxidasa (GPX), pero sin adicionar superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el principal ROS (especies reactivas de oxígeno), responsable de los daños oxidantes del ADN y no el anión superóxido (Baumer *et al.*, 2003a).

La acción determinante del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se debe a la producción del radical hidroxilo por la reacción enlazada de Fenton y Haber-Weiss. El radical hidroxilo es un ROS (especies reactivas de oxígeno) muy reactivo y un potente iniciador de la peroxidación de los lípidos. El radical hidroxilo puede dañar el ADN de dos maneras diferentes, sea de manera indirecta iniciando la peroxidación de los lípidos o de manera directa atacando al ADN. Otro oxidante del ADN es el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) oxidante que resulta de la reacción del monóxido de nitrógeno (NO) con el anión superóxido. (Marnett, 2000).

El principal marcador de este ataque oxidante es el 8-hidroxi-2 'desoxiguanosina (8-OH-Dg), forma oxidada de la base nitrógenada desoxyguanosina. La principal consecuencia de la oxidación del ADN es la fragmentación (Marnett, 2000). El ADN mitocondrial es vulnerable al ataque oxidante por no estar protegido; en cambio la

cromatina contenida en el núcleo espermático está muy condensada por el hecho del remplazo de las proteínas histonas, por las protaminas y la formación de los puentes de disulfuro por la acción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) y de la glutatión peroxidasa 4 (GPX4). De este hecho, el ADN nuclear espermático es normalmente muy resistente a los mecanismos de desnaturalización físicos y químicos. Sin embargo se demostró que una protaminación incompleta hace que los espermatozoides sean más vulnerables al estrés oxidante (Marnett, 2000).

HIPÓTESIS DEL DAÑO OXIDANTE DEL ADN

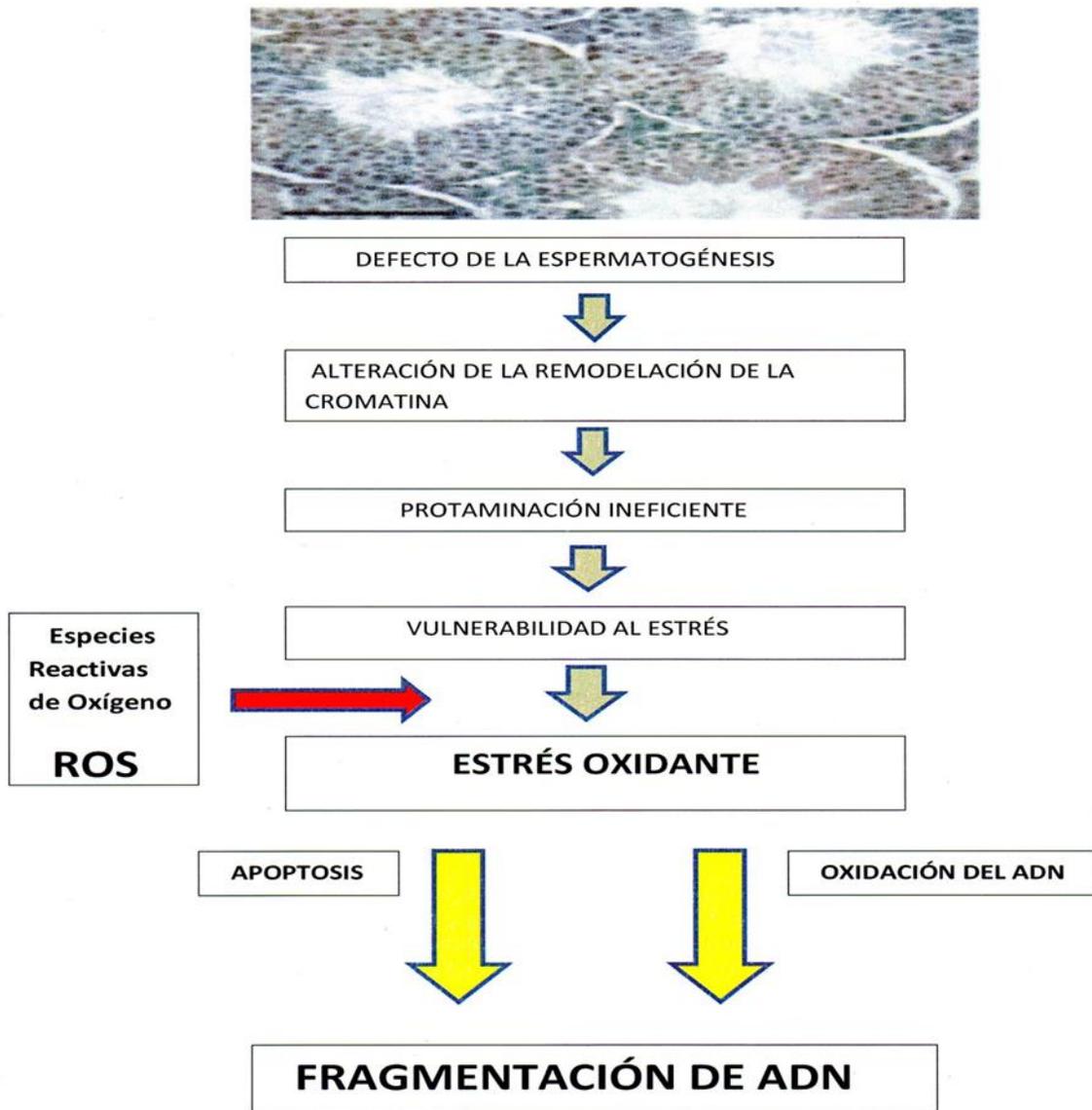


FIG.24 Hipótesis del daño oxidante del ADN en los espermatozoides humanos, tomado de Aitken *et al.*, 2009.

3.1 FACTORES IMPLICADOS EN LA ETIOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDANTE

- **Factores ambientales:** Pesticidas, metales pesados (plomo, cadmio, contaminantes en el aire.
- **Infecciones del tracto genito-urinario:** infección bacteriana prostática. Infección viral.
- **Afecciones inflamatorias e autoinmunes del aparato reproductor:** prostatitis crónica.
- **Origen testicular:** varicocele, criptorquidismo, torsión unilateral del cordón testicular.
- **Factores iatrogénicos:** centrifugación, crioconservación, En la reproducción equina la aparición del estrés oxidante en el semen esta asociado a la preparación y a la conservación del semen para su utilización en inseminación artificial.
- **Modo de vida:** carencia alimentaria en antioxidantes, ejercicio físico intenso, obesidad, estrés, vejez.
- **Medicamentos:** fenilbutazona.

4.- IMPLICACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL PROCESO DE APOPTOSIS

La apoptosis es el proceso fisiológico de muerte celular programada que afecta a las células, sin provocar inflamación de los tejidos circundantes (Ameisen, 1996). En los mamíferos la apoptosis es indispensable al desarrollo normal de las células germinales. Durante la espermatogénesis, la apoptosis mantiene el equilibrio entre las células germinales y somáticas y elimina las células germinales defectuosas (Brum *et al.*, 2008).

Existen dos vías de señalización de la apoptosis, la vía intrínseca o vía mitocondrial, que se inicia por señales pro-apoptóticas intracelulares que liberan el citocromo C del espacio intermembranario mitocondrial hacia el citoplasma. El citocromo C a su vez, estimula las proteasas citosólicas llamadas caspasas. En las células transcripcionalmente activas, la apoptosis puede ser iniciada por los errores de transcripción del ADN y en los daños del ADN. En la vía extrínseca, la fijación de los ligandos sobre los receptores específicos de la muerte celular, al nivel de la membrana plasmática, también activan las caspasas. Estas dos vías llevan a la fragmentación celular y a su muerte (Jin y El Deiry, 2005). La caspasa 9 está implicada en la vía mitocondrial (Shi Y., 2002).

Los ROS (especies reactivas de oxígeno) estimulan la apoptosis por activación de la vía mitocondrial. Los ROS (especies reactivas de oxígeno) no son ni benéficos ni nefastos para la función de los espermatozoides solo tienen que estar en porcentajes apropiados para realizar sus funciones fisiológicas, previniendo su capacidad de provocar daños patológicos (Kothari *et al.*, 2010).

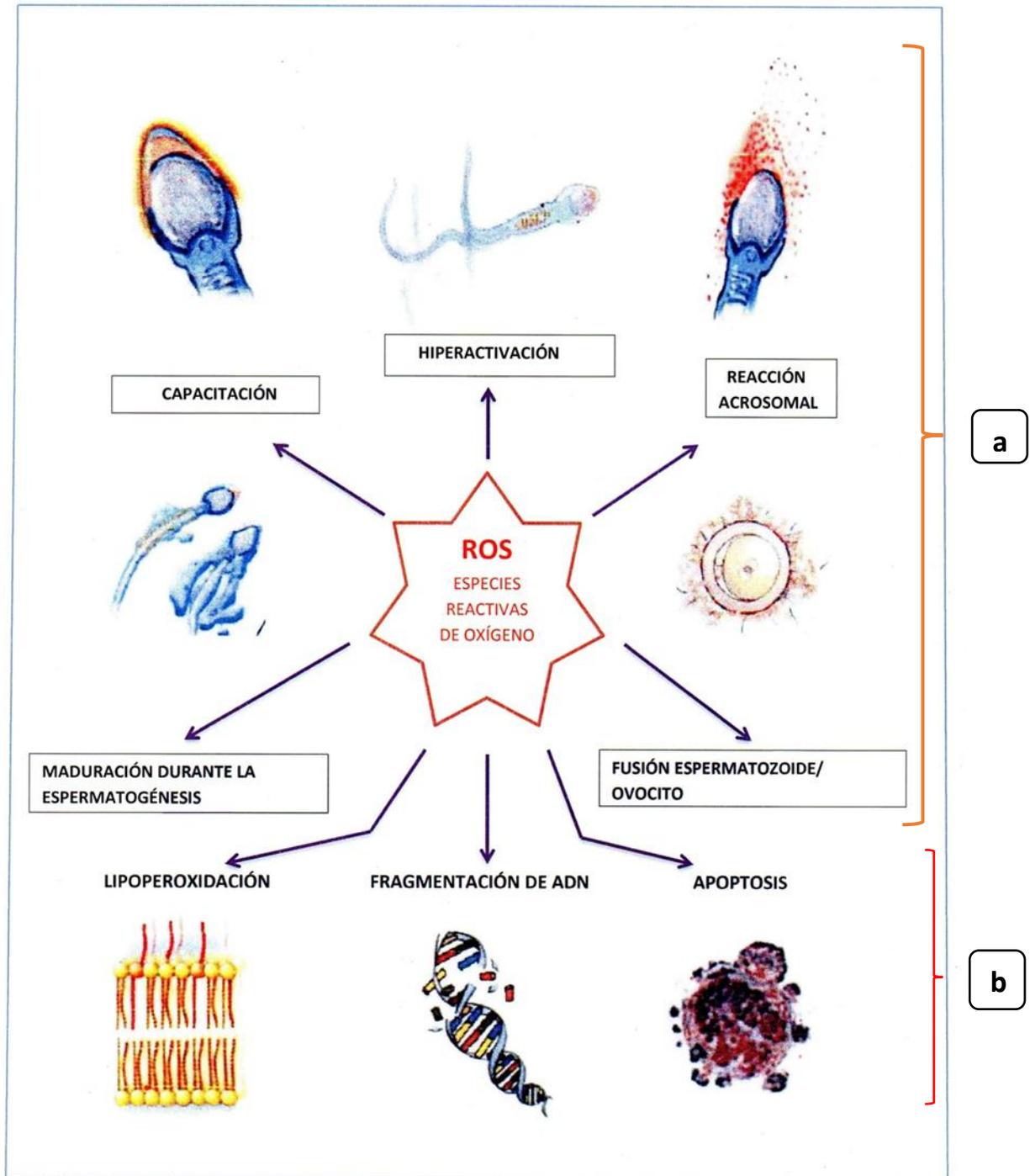


FIG.25 Presentación de las principales acciones fisiológicas (a) y patológicas (b) de las especies reactivas de oxígeno en los espermatozoides tomado de Kothari *et al.*, 2010.

El origen del daño al ADN puede ser por un mal empaquetado de la cromatina, por la apoptosis abortiva que es cuando ocurren anomalías en la apoptosis durante la espermatogénesis y en el estrés oxidativo (Wnuka *et al.*, 2010).

5.- PROTECCIÓN ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA Y NO ENZIMÁTICA DE LOS ESPERMATOZOIDES EQUINOS CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La regulación de la producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) se realiza por diferentes enzimas antioxidantes: el superóxido dismutasa, la catalasa, el glutatión peroxidasa, y la indoleamina dioxigenasa. Estas enzimas antioxidantes están presentes en los espermatozoides y en el líquido epididimario.

Sin embargo la actividad enzimática antioxidante es muy débil en los espermatozoides maduros por la pérdida de la mayor parte del citoplasma durante los estados terminales de la diferenciación (Baumer y Ball, 2005). Después de la eyaculación los espermatozoides maduros son protegidos por el plasma seminal, que contiene una actividad enzimática anti-oxidante importante. Estas enzimas son absorbidas por la membrana plasmática de los espermatozoides equinos (Baumer y Ball, 2005).

También existen otros componentes no enzimáticos presentes en los espermatozoides, en el líquido epididimario y en el plasma seminal capaces de disminuir la producción de los ROS (especies reactivas de oxígeno) durante su paso por el epidídimo y en el semen eyaculado. Estos sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen: α tocoferol o vitamina E , ácido ascórbico o vitamina C, ácidos aminados como taurina y hipotaurina, proteínas y péptidos como la albumina y glutatión, carotenos, flavonoides, metales de transición como zinc y magnesio, selenio, carnitina, vacuolas lipídicas de origen prostático, contenidos en el plasma seminal llamados protosomas (Pons-Rejraji *et al.*, 2009).

6.- FALTA DE INTEGRIDAD DEL GENOMA ESPERMÁTICO

Cuando los espermatozoides equinos son incubados con el sistema generador de ROS (especies reactivas de oxígeno) exógenos (sistema X-XO), se observa un aumento significativo de la fragmentación del ADN (Baumer *et al.*, 2003a). Esta fragmentación del ADN, inducida por los ROS (especies reactivas de oxígeno) exógenos, también se observó en los espermatozoides humanos. La incubación de los espermatozoides con el sistema X-XO durante una hora se asocia a una fragmentación del ADN cuatro veces mas importante que en la ausencia de ROS (especies reactivas de oxígeno) exógenos (Lopez *et al.*, 1998). De la misma manera, la estimulación de la producción endógena de los ROS (especies reactivas de oxígeno) por los espermatozoides humanos, por la utilización de la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), provoca un aumento de la fragmentación del ADN (Twigg *et al.*, 1998). El semen equino incubado a 45°C presenta mas fragmentación de ADN que el semen incubado a 42°C y a 39° C; los espermatozoides equinos sufren apoptosis dependiente de las caspasas en respuesta al choque térmico por calor (Desvousges *et al.*, 2006). Según el tiempo y la temperatura a la cual se almacena el semen puede provocar la fragmentación

del ADN, teniendo en cuenta también el status de fertilidad del semental. El esperma de sementales fértiles almacenado a 5°C con un diluyente a base de leche no presenta fragmentación arriba de las 46 horas de haber sido almacenado; almacenado a 20°C presenta un nivel moderado de fragmentación y almacenado a 37°C presenta un alto nivel de fragmentación. Sin embargo el esperma de sementales subfértiles presenta un incremento de la fragmentación del ADN entre las 20 y 32 horas de haber sido almacenado a 5°C. La fragmentación del ADN no es estrictamente dependiente de la temperatura (Love, 2002.); también depende del tiempo de almacenaje, del tipo de diluyente utilizado y sobre todo de la calidad seminal de los sementales (Love, 2005).

6.1 LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMATOZOIDE CON FRAGMENTACIÓN DE ADN

Se observaron correlaciones negativas entre la fragmentación del ADN en el núcleo espermático, la calidad del semen y la capacidad de fecundación de los espermatozoides humanos *in vitro* (Sun *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1998). De igual manera, la fragmentación del ADN medida por la citometría de flujo de la cromatina espermática (SCSA) tiene una correlación negativa con la fertilidad de los sementales (incluyendo los porcentajes de fertilidad en fin de temporada, el porcentaje de fertilidad por periodo y el porcentaje en el primer periodo) (Love y Kenny, 1998).

Esta asociación entre una baja calidad del eyaculado y la fragmentación del ADN se debe probablemente a los daños peroxidantes colaterales que sufren las membranas plasmáticas espermáticas. Estos daños membranarios son importantes fisiológicamente. En efecto, gracias a su “mecanismo protector”, los espermatozoides que tienen un genoma severamente dañado no pueden participar al proceso normal de la fecundación (Aitken y Krauss, 2001). Sin embargo este “mecanismo protector” parece tener una eficacia limitada ya que el ADN de los espermatozoides humanos parecen ser mas sensibles al estrés oxidativo que al de los lípidos membranarios. En efecto, se observó que a un cierto nivel de estrés oxidativo, los daños del ADN aumentaron pero la capacidad de fusión ovocito-espermatozoide también aumento. Sin embargo si el estrés oxidativo aumenta todavía, se observa un aumento mayor de los daños del ADN y una disminución concomitante de la movilidad y de la capacidad de fusión ovocito-espermatozoide. En consecuencia, es posible que durante el estrés oxidativo, los espermatozoides que presentan una oxidación significativa de su ADN conserven aún así su poder fecundante (Aitken *et al.*, 1998).

IX EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO

Varios métodos han sido utilizados para:

- la evaluación de la integridad de la cromatina y obtener el índice de dispersión de la fragmentación del ADN espermático (DFI) y el índice de supervivencia.
- conseguir la ruptura de las cadenas de ADN.

EL PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)

El procedimiento de evaluación por citometría de flujo de la cromatina espermática (SCSA), utiliza el fluorocromo metacrómico naranja de acridina, y evalúa la susceptibilidad a la desnaturalización de la cromatina de los espermatozoides tratados con ácido (Graham y Mocé, 2005; Varner, 2008).

Este método ha sido empleado en espermatozoides equinos (Love, 2005). Un aumento en la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización inducida, ha sido asociado con una reducción de la fertilidad en machos equinos. Por el contrario en ejemplares de alta fertilidad, se ha observado una menor fluorescencia roja en las muestras seminales sometidas a esta técnica indicando que la cromatina espermática es menos susceptible a la desnaturalización. Adicionalmente, se ha reportado que el método de SCSA, es de gran ayuda para diferenciar diferentes grados de fertilidad en un mismo grupo de animales, definidos como fértiles, siendo de gran utilidad para realizar clasificaciones de los sementales equinos cada vez más precisa en cuanto a esta característica (Turner, 2005).

EL ENSAYO COMETA

El ensayo Cometa es un método basado en la electroforesis en gel, que puede ser usado para medir el daño del ADN en células eucariotas individuales. Además es versátil, relativamente simple de desarrollar y sensible y aunque la mayoría de las investigaciones hacen uso de su capacidad para medir el rompimiento de ADN de cadena sencilla, modificaciones en este método permiten la detección de rompimientos de doble cadena del ADN, de entrecruzamientos, de daños de bases, y de núcleos apoptóticos (Olive y Banáth, 2006).

EL MÉTODO TUNEL

El método TUNEL (TdT- mediated dUtp Nick End Labelling) corresponde a una de las técnicas más usadas mundialmente para la determinación de la fragmentación del ADN, mediante la marcación con deoxiuridina-trifosfato (Dutp) de los rompimientos de cadena sencilla y cadena doble en el ADN de los espermatozoides (Domínguez-Fandos *et al.*, 2007). Un método alternativo y

recientemente implementado en semen equino es la prueba de dispersión de la cromatina del semen (SCD), la cual es una técnica eficiente para analizar la fragmentación del ADN de espermatozoides, y que se basa en la pérdida parcial de protaminas de la cromatina, lo cual se evalúa por microscopía de fluorescencia, discriminando entre los espermatozoides que producen un halo de dispersión de cromatina en la cabeza y aquellos que no presentan dicho halo, para lo cual se emplean como sondas fluorescentes dibromo-4'-hidroximercurio-fluoresceína y yoduro de propidio (Cortés- Gutierrez *et al.*, 2009).

LA PRUEBA DE ISNT (IN SITU NICK TRANSLATION)

La prueba de ISNT (In Situ Nick Translation) es básicamente una técnica de concepción similar al TUNEL ya que permite cuantificar el grado de daño que se produce en el DNA evaluando tras la incorporación de moléculas de dUTP modificado con botina o digoxigenina, o bien marcado directamente el DNA con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la enzima DNA polimerasa I. La mayor diferencia con el TUNEL radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasa y la incorporación de nucleótidos es mayor por utilizar la cadena de DNA complementaria como molde. Los resultados del análisis de ISNT se han utilizado para el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide. Desde el punto de vista práctico, esta técnica tendría las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no existe disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre espermatozoides. (Cortés-Gutiérrez El *et al.*, 2007)

LA PRUEBA DBD-FISH (DNA BREAKAGE DETECTION-FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)

La prueba DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization) Se trata de una metodología relativamente reciente y que se circunscribe al campo de la investigación. Se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del DNA a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali. Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el DNA generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de DNA. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo. Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria por razones similares a las descritas previamente. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño de célula a célula, in situ, en secuencias específicas del DNA (Cortés-Gutiérrez El *et al.*, 2007).

LA PRUEBA DE NARANJA DE ACRIDINA

La prueba de naranja de acridina, utilizando las propiedades metacromáticas de la naranja de acridina, algunos investigadores han aplicado el mismo principio que el utilizado en el SCSA para visualizar los espermatozoides con DNA fragmentado empleando microscopía de fluorescencia. El mayor problema de esta técnica es el componente de la subjetividad del observador en el momento de discriminar entre la emisión del color verde y el naranja de este fluorocromo, dado que existe toda una serie de colores intermedios que probablemente se relacionan con una sensibilidad diferencial a la desnaturalización de los distintos espermatozoides. Además los resultados no parecen muy reproducibles, ya que parecen variar con el tiempo, y no distingue entre pacientes infértiles y donantes (Cortés-Gutiérrez *Et al.*, 2007).

EL AZUL DE TOLUIDINA

El azul de Toluidina es un colorante nuclear básico que genera reacciones metacromáticas cuando interacciona con la cromatina. Cuando este colorante se incorpora en cromatina rica en histonas, con abundancia de lisina, presenta una coloración violeta-azulada intensa, mientras que cuando lo hace a cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul-pálida. Se trataría, en realidad, de una prueba de maduración-condensación nuclear, y los espermatozoides con cromatina inmadura tendrían más habitualmente roturas del DNA. La técnica es simple y de un bajo costo y tiene la ventaja de proporcionar preparaciones permanentes para su uso en un microscopio ordinario, aunque las tinciones intermedias son de difícil valoración. El análisis de los resultados también puede realizarse en citometría de flujo, con los inconvenientes ya mencionados. Desafortunadamente, los resultados son poco reproducibles. (Cortés-Gutiérrez *Et al.*, 2007)

LA CROMOMICINA A3 (CM3)

La Cromomicina A3 (CM3) es un fluorocromo ampliamente utilizado en citogenética debido a que produce una buena diferenciación longitudinal de los cromosomas, ya que se ancla específicamente a regiones ricas en guanina-citosina y compite por los mismos lugares en el DNA, que las protaminas. Por lo tanto, cuando los espermatozoides presentan una tinción intensa tras ser teñidos con CMA3, se interpreta que esta población celular muestra unos niveles bajos de protaminación. Es decir, esta técnica revela espermatozoides que tienen un nivel deficiente de empaquetamiento en su cromatina, siendo también una prueba de maduración-condensación nuclear. De nuevo, una de las limitaciones más importantes de esta técnica es la subjetividad del observador a la hora de establecer los grupos de clasificación. No obstante, algunos estudios la muestran como una prueba de

elección frente a la naranja de acridina, o derivados de la toluidina, para el análisis de la maduración nuclear del espermatozoide (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

PRUEBA DE LA DISPERSIÓN ESPERMÁTICA

La prueba de la dispersión espermática (SCD) se basa en dos fenómenos: el primero es que las hebras de ADN que contienen roturas en su ADN son más fáciles de ser desnaturalizadas utilizando esos puntos de rotura. De hecho, los extremos de las roturas, que pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, son los orígenes de la desnaturalización cuando éstos se enfrentan a un tratamiento de carácter ácido. El segundo fenómeno es que los bucles compactados de fibra de cromatina nuclear, compuestas de ADN y proteínas, se desempaquetan cuando se extraen proteínas nucleares. Este proceso de relajación de los bucles de cromatina tras un tratamiento desproteinizante, da lugar a halos periféricos de cromatina/ADN que emanan del residuo nuclear central, según el modelo propuesto por Cook y Brazell en 1980. (Cook y Brazell, 1980)

Fig. 26 Resumen de las metodologías utilizadas para evaluar alteraciones en el DNA de espermatozoides, así como de algunas de sus ventajas e inconvenientes en relación con la aplicación clínica de rutina, tomado de Cortés-Gutiérrez El *et al.*, 2007.

Metodologías que se basan en el marcaje de roturas del DNA				
Método	Instrumental	Ventajas	Desventajas	Utilidad clínica
TUNEL	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Cumple con parámetros de control de calidad	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina Reproducción asistida Pérdidas fetales
ISNT	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Reacción de marcaje directo	Equipo sofisticado y costoso	Fertilidad masculina
Metodologías que se basan en la susceptibilidad del DNA para desnaturalizarse				
SCSA	Citometría de flujo	Punto de corte establecido (30%) para diferenciar pacientes fértiles e infértiles	Instrumentación costosa Capacitación técnica	Recomendada en estudios epidemiológicos de infertilidad
COMETA	Microscopio Fluorescencia Electroforésis DNA	Bajo costo	Lento de ejecución Requiere observador con experiencia	Fertilidad masculina Reproducción asistida Criopreservación de esperma
SCD	Microscopio Fluorescencia campo claro	Análisis simple de resultados Bajo costo	Aún no determinada	Aún no determinada Variocele?
DBD-FISH	Microscopio Fluorescencia	Revela modificadores estructurales de la cromatina.	Procedimiento sofisticado y costoso	Aún no determinada
Otros métodos				
NA	Microscopio Fluorescencia Citometría de flujo	Bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Diferencias significativas en patologías andrológicas
AT	Microscopio campo claro	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.
CMA	Microscopio Fluorescencia	Método simple y de bajo costo	Subjetiva Poco reproducible	Evaluación de anomalías en la cromatina.

TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling. ISNT = In situ Nick Translation. DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization. SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay. SCD: Sperm Chromatin Dispersion. NA: Naranja de Acridina. AT= Azal de Toluidina. CMA: Cromocitina A3.

X RECOLECCIÓN DE SEMEN EQUINO

La obtención de semen es una técnica utilizada actualmente en la reproducción equina que se emplea para evaluar:

- la capacidad reproductiva de los sementales.
- la calidad del semen ya sea para montas directas o para inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado.

La inseminación artificial (IA) se ha desarrollado en los últimos años debido a las ventajas que aporta a la reproducción equina, podemos destacar el aumento del número de yeguas inseminadas por un mismo semental, la posibilidad de almacenar y transportar el semen y la disminución de los accidentes en los animales y en las personas ocurridos durante la monta. Cuando se aplican en forma adecuada las técnicas actuales de inseminación artificial (IA) pueden dar como resultado tasas de concepción iguales o incluso superiores a las obtenidas mediante la monta natural. Los inconvenientes de la inseminación artificial son: que se debe de conocer la metodología y tener experiencia para aplicar esta técnica y que el personal conozca el manejo del semen. Se requiere de una tecnología y un equipamiento mínimo que permita una correcta recolección, evaluación, y preparación del semen. No todos los sementales poseen un semen capaz de soportar los sistemas de refrigeración y congelación. Es necesario llevar un perfecto control del ciclo estral de la hembra pues en muchas ocasiones, un manejo reproductivo deficiente (mala detección de periodos fértiles, y frecuencia de las inseminaciones) puede provocar un descenso en la fertilidad. Los costos se ven incrementados pues es necesario tener el equipo para la preparación y el almacenamiento del semen.

1.- MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL SEMEN

-Vaginas artificiales

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.

La mayoría de los sementales aceptan la vagina artificial sin que esto afecte a su comportamiento sexual pudiendo alternar colecciones 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 la temperatura adecuadas. Normalmente se emplean 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; 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. 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 espermicidas, 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 liviana y de fácil manejo, además permite una estimulación externa del glande del semental (efecto cérvix) o de la base del pene (Yates y Whitacre, 1993).

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 colección del semen (Yates y Whitacre, 1993).

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 (Yates y Whitacre, 1993).

Los **modelos Colorado, Lane y CSU (Colorado State University)** 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 (Yates y Whitacre, 1993).

La **vagina Polaca o Krakow** 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 (Yates y Whitacre, 1993).

El **modelo INRA** (elaborada por el Instituto Nacional de Investigación agrícola en Francia) es una vagina similar a la polaca. Es un modelo abierto en su extremo distal lo que nos permite la recogida fraccionada del semen.

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. 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 (Yates y Whitacre, 1993).

La utilización del dummy o maniquí requiere de un periodo de entrenamiento. Inicialmente se coloca una yegua en estro junto al maniquí como estímulo sexual 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. (Lindeberg *et al.*, 1999). Existe un modelo de maniquí, el modelo Equidame® phantom, que lleva incorporada una vagina artificial abierta en su interior y un sistema computarizado para la recogida de las distintas fracciones (Lindeberg *et al.*, 1999).

- El 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. No todos los caballos aceptan la manipulación necesaria para la colocación del preservativo o consiguen eyacular en él (Yates y Whitacre, 1993).

- La masturbación

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 (Crump, 1989).

La técnica consiste en colocar al semental en un potro de contención (maniquí) 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 (Crump, 1989).

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 que el semental ha sido entrenado se puede repetir con la frecuencia necesaria sin afectar al comportamiento sexual del animal (Crump, 1989) (Crump, 1994) (Mc Donnell y Love, 1991)(Mc Donnell *et al.*, 1991).

- El 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 y 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 monta.

Según la empresa comercializadora (www.colectorcervical.com) no se encuentran diferencias microbiológicas significativas entre las colecciones 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 costo económico es muy pequeño, y la versatilidad del método permite que se realice en condiciones de campo (Mc Donnell *et al.*, 1991).

- Inducción química

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. Se usan varios fármacos a fin de provocar la eyaculación en équidos:

- Xilacina (Mc Donnell y Love, 1991b) (Mc Donnell, 1993).
- Clomipramina hydrochloride; en combinación con xilacina.
- Imipramina en combinación con xilacina (Mc Donnell y Odian, 1994) (Mc Donnell, 1993) (Clire *et al.*, 1997) (Card, 1997) (Johnson, 1998).
- Imipramina; en bajas dosis en équidos produce erección y masturbación. (Mc Donnell y Odian, 1994).

- Detomidina (Blanco *et al.*, 1997) (Rowley *et al.*, 1999).
 - Prostaglandinas.
 - Gonadotropina coriónica humana (HCG) en combinación con Prostaglandinas.
- Una vez que se inyecta el fármaco. Se espera unos 10 min, para que se produzca la protusión o erección; la eyaculación se produce independientemente a éstas entre los diez minutos y media hora después de la aplicación del fármaco.

- Extracción de espermatozoides del conducto epididimario

Los espermatozoides de epidídimo pueden obtenerse post mortem, o tras la castración. 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 el cuerpo, los espermatozoides comienzan a tener capacidad fecundante y que en la cola 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 (Braun *et al.*, 1994).

- La electroeyaculación

Esta técnica es muy utilizada en otras especies como en el vacuno o en especies salvajes para creación de bancos genéticos pero en los équidos produce un gran sufrimiento que incluso puede llegar a provocar la muerte del semental. Además la muestra colectada es de mala calidad o puede resultar contaminada con orina por lo que es mucho más conveniente el uso de otras técnicas como la recolección manual o la vagina artificial. Sin embargo se usa cuando los caballos han sufrido traumas o accidentes que comprometen su vida y serán eutanasiados y se quiere conservar su semen. Entonces se les anestesia, se les efectúa un lavado de vejiga y se aplica el electroeyaculador (Collins *et al.*, 2006) (Cary *et al.*, 2004) (Stover *et al.*, 1981).

2.-PREPARACIÓN PARA LA RECOLECCIÓN DEL SEMEN

- Preparación de la yegua

La yegua debe tener una buena sujeción para no lastimar al semental, sus miembros posteriores deben inmovilizarse con el tira pie, la cola vendada y desviada. La región perineal debe limpiarse y secarse.

La yegua debe estar en celo natural o inducido. Para inducir el celo podemos utilizar lo siguiente:

Para estimular la ovulación de los folículos podemos utilizar Gonadotropina coriónica humana (hCG). Se aplica una inyección de Gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía intramuscular o intravenosa, 24 h después del inicio del celo. La dosis puede variar entre 1500 UI a 5000 UI, asegurándose que el folículo este en crecimiento y no atrésico; con un tamaño superior a 30 o 35 milímetros. La ovulación se producira a las 48h de haber puesto la inyección.

De siete a nueve días después de la ovulación podemos aplicar 10mg o 1 a 2 mililitros de prostaglandinas (PGF₂α) por vía intramuscular. El estro se produce 3 a 4 días después de la aplicación de las prostaglandinas y la ovulación se presenta de 8 a 12 días después de la aplicación del tratamiento.

Cuando las yeguas no presentan calor se aplica una dosis cotidiana de 150 mg o 2 mililitros de progesterona por vía intramuscular durante 10 a 15 días. A este tratamiento se le puede asociar estradiol 17β aplicando una dosis cotidiana de 10 mg por vía intramuscular durante 10 a 15 días.

También podemos usar una yegua ovariectomizada mantenida con altos niveles de estrógenos exógenos (1-2 mg cipionato de estradiol, (ECP), vía intramuscular semanalmente). (Ginther, 1992; Palmer, 1993; Voss; 1993; Linderberg *et al.*, 2002)

Las yeguas deben ser monitoreadas regularmente para detectar si están en celo. En lugar de las hembras puede usarse un dummy o un maniquí si el semental ya está adiestrado.

- Preparación del semental

Previo a la recolección, el pene del semental debe ser examinado para detectar posibles lesiones. Para lograr la exteriorización del pene, se presenta la yegua al semental de modo que ni ella, ni el semental, ni el personal corran peligro y puedan realizarse las maniobras apropiadamente. Una vez que se exteriorizó el pene, el operador lo toma con una mano, lo desvía y con la otra comienza la limpieza con agua tibia a 37 ° C sin jabón ni desinfectantes ya que los mismos remueven la flora bacteriana normal y permite el crecimiento de microorganismos patógenos, por ejemplo *Pseudomona aeruginosa* (Jussiaux y Trillaud 1977).

Previo a la recolección de semen para descartar una infección del tracto genital del macho se debe realizar un análisis bacteriológico. La toma de muestras para cultivo debe hacerse antes del lavado del pene. Se toman cuatro muestras: de la superficie del pene, de la fosa del glande, de la uretra pre colección y de la uretra post colección. Los hisopos deben remitirse al laboratorio en medio de transporte, por ejemplo Stuart (Jussiaux y Trillaud 1977).

- Preparación de la vagina Missouri

La vagina Missouri debe estar limpia, con su funda de piel. La camisa de plástico o liner debe deslizarse en el interior de la vagina; fijarse al exterior de ella con un elástico por el lado ancho y por el otro lado debe estar conectada al biberón colector que tendrá en el interior el filtro para separar el gel o plasma seminal del eyaculado. El agua con que se completa la cámara de agua debe tener una temperatura de 50-52°C, de manera que la temperatura interna sea de 42-45° C. Es sumamente importante que la temperatura sea medida mediante un termómetro y nunca sea “estimada”; si la temperatura es inferior a la citada no habrá suficiente estímulo para la eyaculación y si es superior se podrá “quemar” al semental. La cantidad de agua a colocar debe acomodarse al tamaño del pene de manera tal que la presión sea uniforme a lo largo de toda la vagina artificial y no dificulte la penetración y erección completa del pene. Si la presión es excesiva no permitirá la correcta intromisión del pene con lo cual el semen tomará contacto con las paredes de la vagina artificial a altas temperaturas y se alterará la calidad de la muestra.

La superficie interna de la camisa de plástico o liner debe lubricarse con algún elemento no espermicida, tal como gel estéril (K-J lubricating jelly), la vaselina sólida daña la camisa de látex.

El eyaculado debe protegerse de la luz y mantenerse a temperatura corporal hasta ser transportado al laboratorio.

- La zona de recolección

La zona de recolección de semen debe ser un área espaciosa, libre de obstáculos, limpia, libre de cualquier distracción para el caballo. La disponibilidad de espacio es muy importante para la seguridad tanto del que maneje al semental, como el que lleve la vagina artificial o de la yegua (si se usa para la colección) o del propio semental. Un espacio suficiente puede permitirnos mover al semental y a la yegua con facilidad y seguridad. Algunos caballos se distraen mucho, por eso es importante buscar espacios tranquilos y en los que los sementales se habitúen a la donación de semen.

El piso del espacio de recolección es de gran importancia, deben evitarse siempre los suelos resbaladizos que pueden causar importantes lesiones tanto al semental como a la yegua, si se utiliza. Pueden utilizarse materiales antideslizantes de fácil lavado o simplemente suelos de tierra o arena.

La temperatura ambiente debe tenerse también en cuenta, de forma que si hace mucho frío y el semental se demora en la monta la temperatura de la vagina artificial también va a enfriarse y como consecuencia podemos tener una mala respuesta del caballo.

Así mismo, la distancia entre la zona de recolección y el laboratorio debe ser mínima. Debe ser fácil preparar la vagina artificial, calentar el agua, pero fundamentalmente diluir inmediatamente el semen tras su recolección.

- Recolección del semen

El operador encargado de recolectar el semen debe colocarse generalmente del lado izquierdo junto con el personal que maneja al semental. Debe estar muy atento a las reacciones tanto de la hembra como las del macho.

Sólo cuando el semental logra la erección, se le permite montar a la yegua o maniquí. El operador desvía el pene y presenta la vagina artificial al semental para que mediante el reflejo de búsqueda, logre él mismo la intromisión. Es conveniente proporcionarle una posición confortable para lograr una máxima estimulación.

Con la mano izquierda se sostiene la vagina artificial apoyándola contra la hembra y la mano derecha se coloca ventral al pene con el objeto de palpar las pulsaciones asociadas con la eyaculación. La palpación de estas pulsaciones junto con el flameo de la cola durante la eyaculación y la presencia de restos de semen o gel en el orificio uretral una vez terminada la recolección, y pérdida de la erección evidencian que la eyaculación se ha llevado a cabo. Inmediatamente después de la retirada la vagina artificial debe colocarse ésta en posición vertical y permitir la salida de agua a través de la válvula para dejar que el semen que haya quedado en porciones altas de la vagina drene hacia la bolsita o botella recolectora.

- Evaluación del semen

Inmediatamente después de la recolección se toma una parte de la muestra para efectuar el espermiograma y al resto de la muestra se le mezcla con el diluyente elegido y a la proporción adecuada según el proceso al cuál va hacer sometido

3.- MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL SEMEN EQUINO COLECTADO

Una vez obtenido el eyaculado debe ser transportado lo antes posible al laboratorio protegiéndolo de la luz solar, y el choque por frío. Todos los elementos utilizados para la evaluación deben estar pre calentados a 37° C.

TÉCNICAS CONVENCIONALES:

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA Y FILTRADO.

El primer paso es el filtrado de la muestra para eliminar posibles detritus y la porción gelatinosa esto se hace generalmente al poner un filtro al envase colector del semen en la vagina artificial. Se observa el **color, densidad, olor, pH y volumen** de la porción libre de gel. El volumen se utiliza para calcular el número total de espermatozoides. El examen del color permite observar la presencia de sangre, orina o material purulento en el eyaculado. La valoración del pH puede realizarse con un potenciómetro.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA:

- Concentración espermática.

El cálculo del número total de espermatozoides es importante ya que éste es uno de los parámetros más usados para estimar la fertilidad de un semental aunque esté sujeto a múltiples factores de variación, como por ejemplo: estación del año, frecuencia de servicios, edad, tamaño testicular, la raza. etc. (Jordán, 1988) (Gebauer y Pickett, 1974) (Heyne, 1979).

El número total de espermatozoides se obtiene por la multiplicación de la concentración espermática por el volumen de la porción libre de gel del semen.

La concentración puede calcularse mediante un espectrofotómetro, contador automático de células espermáticas y hemocitómetro (Dowsett, 1988; Yates y Whitacre, 1988). El método del hemocitómetro (cámara de Neubauer), es el más utilizado en el medio (Díaz y Arancibia, 1971).

- Motilidad espermática.

La motilidad espermática refleja la viabilidad de un eyaculado. Por lo general se realiza la estimación visual de la motilidad colocando una gota de semen puro entre porta y cubre objetos y observando sobre una platina térmica a 37° C con microscopio óptico con 400 aumentos (objetivo de 40X). Aunque la estimación es bastante subjetiva, el personal experimentado puede realizar un análisis muy aceptable de la motilidad progresiva. Es interesante comparar y registrar el porcentaje de motilidad progresiva de la muestra sin diluir y luego del agregado de diluyente. La supervivencia del eyaculado puede evaluarse manteniendo el mismo a una temperatura entre 20-25 ° C con y sin agregado de diluyente y observar como varía la motilidad progresiva en función del tiempo. También puede almacenarse una alícuota de semen diluido a una temperatura entre 4-5° C; generalmente el agregado de diluyente puede preservar la muestra entre 24-48 horas (semen refrigerado). Si bien la evaluación de la motilidad progresiva es de carácter subjetivo, se ha observado frecuentemente que dentro de las características seminales, esta sería la que mejor estima la fertilidad real de un eyaculado (Voss *et al.*, 1981; Caudle y Fayrerhosken, 1989).

Según Díaz y Arancibia (1971), eyaculados con 50% de motilidad progresiva podrían ser clasificados como regulares respecto a su fertilidad potencial (Díaz y Arancibia, 1971).

- Morfología y viabilidad espermática.

La estimación de la viabilidad y de la morfología se puede realizar mediante una tinción con eosina /negrosina, la técnica consiste en mezclar 10µl de semen, con 10µl de eosina/nigrosina sobre un portaobjeto, homogenizar bien y hacer un frotis sobre un porta objeto a 37°C. El resultado se expresa en porcentaje de

espermatozoides no teñidos que se toman como espermatozoides vivos por tener su membrana intacta y el porcentaje de los espermatozoides con coloración que ya estaban muertos y su membrana ya estaba dañada (Díaz y Díaz 1989).

También se pueden utilizar otras tinciones para realizarlos: Casarett, Wright's, May Grunwald-Giemsa, hematoxilina-eosina, nigrosina, Diff-Quik, etc. Estas tinciones permiten visualizar no sólo células espermáticas sino también células germinales inmaduras y somáticas (Díaz y Díaz 1989).

Otro método para observar morfología es tomar una alícuota de la muestra y fijarla en solución salina formolada bufferada (BSF) o solución bufferada de glutaraldehído. Esta técnica permite transportar la muestra y preservarla por tiempo prolongado si no se puede realizar la lectura en el momento. Las muestras así fijadas se deben observar con ayuda de un microscopio óptico, de contraste de fase o de contraste diferencial-interferencial (DIC), (Díaz y Díaz 1989).

Las anormalidades espermáticas pueden clasificarse según el origen de cada una de ellas en: a) primarias: originadas durante el proceso de espermatogénesis, es decir son de origen testicular; b) secundarias: originadas en cualquier sitio del sistema de túbulos que transportan los espermatozoides; c) terciarias: originadas por manipulación incorrecta del semen luego de la recolección. El número total de espermatozoides morfológicamente normales en un eyaculado puede proporcionar más información y correlación respecto de la fertilidad de un semental que el porcentaje o el número absoluto de espermatozoides morfológicamente anormales. La importancia de las anormalidades espermáticas para la clasificación de la fertilidad potencial de los machos, así como su relación directa con la fertilidad real, es aceptada por la mayoría de los investigadores (Díaz y Díaz 1989).

En relación a la metodología cada laboratorio, e incluso cada investigador, usa el método que su experiencia le ha indicado como más apropiado. Sin embargo, pareciera que la mayoría de los laboratorios prefieren usar métodos tintoriales (Díaz y Díaz 1989).

- Integridad de la membrana

La integridad de la membrana plasmática puede ser considerada como un indicador indirecto de la vitalidad de los espermatozoides. La prueba hipoosmótica (HOST), es una técnica desarrollada para evaluar la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática de estos; su principio consiste en que al ser sometidos a condiciones hipoosmóticas, solamente los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia. La afluencia de agua solo se produce en la región de la cola y crea diferentes tipos de enrollamiento, lo cual es una señal de que el agua ha sido transportada de una manera fisiológica en la célula, en un esfuerzo por mantener la dinámica de equilibrio entre los líquidos de su compartimiento interno y el entorno extracelular. Esta respuesta se asocia con el grado de integridad normal y de actividad funcional

de la membrana, requisito indispensable para que se dé la reacción acrosómica durante el proceso de fertilización.

Para evaluar también la integridad de la membrana plasmática se pueden realizar tinciones supravitales, como el Verde Rápido/Eosina, la Eosina/Azul de Anilina, el Tripán Azul/Giemsa, el Amarillo de Naftol/Eritrosina, la Eosina/Nigrosina, el Rosa de Bengala y el Café de Bismark, entre otros; usando el microscopio óptico, el de contraste de fases (Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006).

-Reacción acrosomal

La reacción acrosomal se puede evaluar con la tinción Azul Brillante de Coomassie, y observarla con microscopio óptico. También se puede usar la tinción de Rosa de bengala y observarla al microscopio de contraste de fases.

-Valores seminales en equinos

Parámetros	Media \pm SD	Número de Sementales	Referencia
Volumen libre de Gel (ml)	65 \pm 26	398	(Parlevliet et al., 1994)
	45 \pm 30	417	(Pickett, 1993)
	33,7 \pm 2,13	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	51,6 \pm 31,5	8	(Long et al., 1993)
	45,3 \pm 30,9	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Concentración (10 ⁶ /ml)	206,1 \pm 168,5	398	(Parlevliet et al., 1994)
	335 \pm 232	417	(Pickett, 1993)
	164,13 \pm 39,35	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	223 \pm 148	8	(Long et al., 1993)
	178 \pm 168	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Número total de Espermatozoides (10 ⁹)	11,29 \pm 7,13	398	(Parlevliet et al., 1994)
	11,9 \pm 9	417	(Pickett, 1993)
	6,34 \pm 1,93	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	9,1 \pm 4,7	8	(Long et al., 1993)
	7,21 \pm 6,87	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
Motilidad Total (%)	53 \pm 15	417	(Pickett, 1993)
	76,43	165	(Dowsett and Knott, 1996)
	72,1 \pm 16	47	(Dowsett and Pattie, 1982)
	70,3 \pm 17,4	64	(Jasko et al., 1992)
Espermatozoides Vivos (%)	65 \pm 9	398	(Parlevliet et al., 1994)
	82,56	165	(Long et al., 1993)
	78,8	47	(Jasko et al., 1992)
Motilidad Progresiva (%)	68 \pm 9	398	(Parlevliet et al., 1994)
	53,1 \pm 16,2	8	(Long et al., 1993)
	52,7 \pm 17,4	64	Jasko et al.1991

Espermatozoides	66±15	398	(Parlevliet et al., 1994)
con	51±15	417	(Pickett, 1993)
Morfología Normal	67,82	165	(Dowsett and Knott, 1996)
(%)	47,5±12,4	8	(Long et al., 1993)
	58,2	47	(Dowsett and Pattie, 1982)

FIG.27 Tabla de valores seminales en equinos varios autores (Pickett.1993)

TÉCNICAS AVANZADAS

Evaluación seminal por técnicas fluorescentes

El descubrimiento de una variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes, ha permitido un análisis más amplio de los atributos de los espermatozoides. La evaluación del semen equino por técnicas fluorescentes puede valerse de diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares. Las principales técnicas utilizadas son la microscopía de fluorescencia, la fluorimetría y la citometría de flujo; esta última utilizada para evaluar un amplio número de características de integridad, vitalidad y función de los espermatozoides. Sin embargo, a pesar de que se ha reportado un gran número de estudios *in vitro* acerca de la utilización de este tipo de técnicas para reconocer diferentes componentes del semen equino, incluyendo la membrana plasmática, el acrosoma, las mitocondrias y una gran variedad de proteínas específicas, faltan investigaciones que asocien estos resultados *in vitro* con la fertilidad del macho equino (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

Nuevos procedimientos para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática han sido reportados mediante el uso de las sondas fluorescentes como SYBR-14 y el yoduro de propidio (PI). Ambos fluorocromos actúan mediante la penetración de la membrana espermática, y evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide, marcando las células viables y las bombas iónicas funcionales. Comercialmente el kit de vitalidad espermática más comúnmente utilizado denominado LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc.), combina dichos fluorocromos, eliminando la ambigüedad de su uso por separado. SYBR-14 identifica a todos los espermatozoides en la muestra (vivos y muertos), mientras que el yoduro de propidio (PI) solo tiñe los núcleos de los espermatozoides muertos. Con esta combinación, el núcleo de los espermatozoides vivos fluoresce verde (SYBR-14), mientras las células degeneradas, las cuales han perdido la integridad de su membrana, se tiñen de rojo (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013)

- Evaluación del acrosoma

El marcador de contenido acrosomal FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína) se une al contenido acrosomal de los espermatozoides de la especie humana y equina, luego de la permeabilización de la membrana plasmática, determinando así la presencia o ausencia de la matriz acrosomal. Con esta técnica se pueden identificar claramente dos patrones: el primero corresponde a los acrosomas que fluorescen completamente de color verde, indicando un acrosoma intacto; y el segundo como solo una banda fluorescente en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, indicando la ocurrencia de la reacción acrosómica. Dicha reacción también puede observarse mediante otra técnica de tinción con lectinas combinadas que utiliza la sonda de fluorescencia FITCPNA (aglutinina de maní conjugada con isotiocianato de fluoresceína). El antibiótico fluorescente Clortetraciclina (CTC) también produce patrones fluorescentes que reflejan el estado acrosomal. La CTC puede ser usada en espermatozoides no fijados o fijados con glutaraldehído; sus patrones de fluorescencia varían entre especies, y ha sido probada en espermatozoides equinos. El estado del acrosoma también puede ser determinado usando la sonda fluorescente acidotrópica LysoTracker®Green DND-26. (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Evaluación de la integridad del ADN espermático equino

Varios métodos han sido utilizados para la evaluación de la integridad de la cromatina y obtener el índice de dispersión de la fragmentación del ADN espermático (DFI) y el índice de supervivencia.

+ Sistemas de análisis de semen asistido por computador (CASA)

El uso del análisis de semen asistido por computador (CASA) ha permitido una medición objetiva de muchos parámetros de la movilidad de semen, ofreciendo observaciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen visual. Muchos sistemas CASA están disponibles comercialmente, los cuales varían en su modo de funcionamiento, y en su habilidad para detectar y medir la movilidad de los espermatozoides de diferentes especies. La mayoría de sistemas CASA como los sistemas ISAS® (Integrated Semen Analysis System) o CEROS® (Sperm Analyzer) graban la trayectoria y el tipo de movimiento de los espermatozoides mediante una cámara de video; esta información es analizada matemáticamente para cada espermatozoide en cierto número de cuadros, y es expresada en forma numérica; todo a través de una serie de variables como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal (VSL), el coeficiente lineal (LIN), y la frecuencia de desplazamiento de la cabeza (BCF), entre otras. Sin embargo, estas variables carecen de valores estándar definidos para lo que es normal y anormal en el

movimiento del espermatozoide, y aún no se ha implementado una reglamentación internacional para los ajustes del equipo. Por tal razón, no se ha llegado a un acuerdo sobre los valores de los parámetros de análisis estándar dentro de una especie determinada, lo que dificulta la comparación de los resultados entre los laboratorios. Adicionalmente en ausencia de una estandarización confiable y repetible de los parámetros seminales a evaluar en cada especie y de una lectura crítica de los resultados, las estimaciones arrojadas por este tipo de sistemas podrían conducir a valoraciones sesgadas de la calidad real de las muestras evaluadas, y de su relación con el potencial fertilizante del semen (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

El procedimiento de evaluación por citometría de flujo de la cromatina espermática (SCSA), utiliza el fluorocromo metacromático naranja de acridina, y evalúa la susceptibilidad a la desnaturalización de la cromatina de los espermatozoides tratados con ácido. Este método ha sido empleado en espermatozoides equinos. Un aumento en la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización inducida, ha sido asociado con una reducción de la fertilidad en machos equinos. Por el contrario, en ejemplares de alta fertilidad, se ha observado una menor generación de fluorescencia roja en las muestras seminales sometidas a esta técnica, indicando que la cromatina espermática es menos susceptible a la desnaturalización.

+ **El ensayo Cometa** es un método basado en la electroforesis en gel, que puede ser usado para medir el daño del ADN en células eucarióticas individuales. Además, es versátil, relativamente simple de desarrollar y sensible, y aunque la mayoría de las investigaciones hacen uso de su capacidad para medir el rompimiento de ADN de cadena sencilla, modificaciones en este método permiten la detección de rompimientos de doble cadena del ADN, de entrecruzamientos, de daños de bases y de núcleos apoptóticos.

+ **El método TUNEL** corresponde a una de las técnicas más usadas mundialmente para la determinación de la fragmentación del ADN, mediante la marcación con deoxiuridina-trifosfato (dUTP) de los rompimientos de cadena sencilla y cadena doble en el ADN de los espermatozoides.

+ **Un método alternativo y recientemente implementado en semen equino es la PRUEBA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA DEL SEMEN (SCD)**, la cual es una técnica eficiente para analizar la fragmentación del ADN de espermatozoides, y que se basa en la pérdida parcial de protaminas de la cromatina, lo cual se evalúa por microscopía de fluorescencia, discriminando entre los espermatozoides que producen un halo de dispersión de cromatina en la cabeza y aquellos que no presentan dicho halo, para lo cual se emplean como sondas fluorescentes dibromo-4'-hidroximercurio-fluoresceína y yoduro de propidio. Para esta prueba se puede usar el kit de Hallomax que es una prueba que diagnóstica *in vitro* los niveles de fragmentación del ADN (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013). La prueba de dispersión de la cromatina del semen (SCD) ha sido adaptada para visualizar el daño en los

espermatozoides equinos y la metodología consta de tres pasos principales: (1) inclusión de los espermatozoides en una matriz inerte semisólida, tipo agar, sobre un portaobjetos, (2) incubación de la muestra en un medio ácido para provocar la desnaturalización del ADN, (3) tratamiento de los espermatozoides sometidos a desnaturalización con una solución de lisis para eliminar de forma controlada las proteínas nucleares. Las preparaciones obtenidas de esta forma, se fijan y se deshidratan en una serie de alcoholes (etanol al 70%, 90% y 100%) para proceder posteriormente a una tinción que se observa bajo el microscopio óptico tanto de campo claro como de fluorescencia. Las tinciones que pueden utilizarse para observar las muestras con el microscopio óptico de campo claro son: Diff Quik, Wright.

Una vez realizada la técnica, podemos observar tres tipos de espermatozoides. La siguiente clasificación se utiliza en equinos:

- **Fragmentados**.- En ellos se forma un halo característico de dispersión de los bucles de ADN en torno a un núcleo denso central o bien los halos no aparecen.
- **No fragmentados**- Los halos son de un tamaño muy reducido.
- **Degradados**.- Espermatozoides sin halo, con núcleo desorganizado. (Clasificación por comunicación personal del Dr. Michael E. Kjelland)

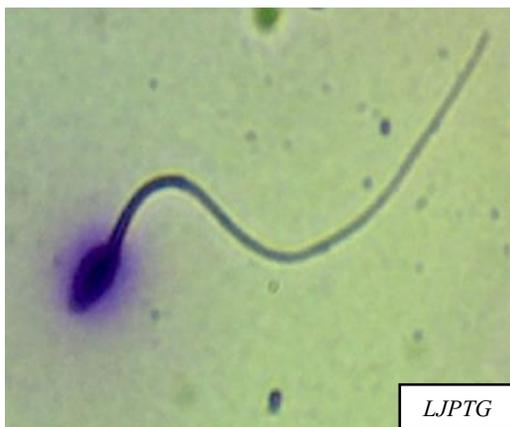


FIG.28 Espematozoide equino normal no fragmentado. Tinción DIFF QUIK. (LJPTG)

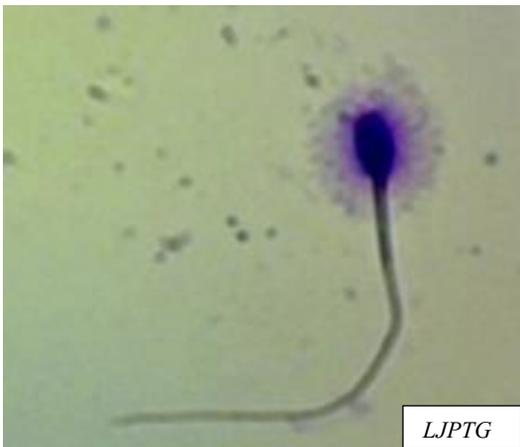


FIG.29 Espermatozoides equinos fragmentados. Tinción DIFF QUIK (LJPTG)

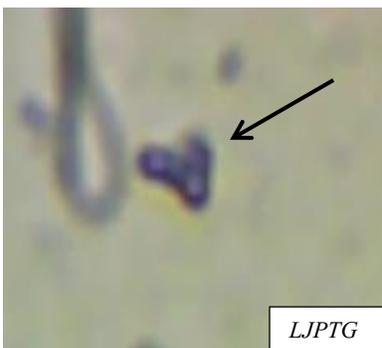


FIG.30 Espermatozoide equino degradado. Tinción DIFF QUIK (LJPTG)

- Evaluación de la actividad mitocondrial

La polaridad es una medida del potencial de la membrana mitocondrial interna. Las diferencias en la magnitud del potencial de membrana, han sido relacionadas con los niveles de respiración, y la habilidad de estas organelas para participar en la regulación de la homeostasis del calcio. El JC-1 (5,5', 6,6'- tetracloro-1,1', 3,3'-yoduro de tetra-etil-benzimidazolil-carbocianina) es un colorante fluorescente que se acumula en la mitocondria y que es conocido por su propiedad de discriminar entre células con un alto y un bajo potencial de membrana mitocondrial. Como está altamente relacionado con la tasa de respiración mitocondrial, el JC-1 puede ser usado como un indicador de actividad mitocondrial. A potenciales de membrana relativamente bajos (<100 mV), el JC-1 usualmente existe como un monómero con fluorescencia verde, detectado en el canal de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de un microscopio de fluorescencia. Sin embargo cuando el potencial de membrana mitocondrial se incrementa (>140mV), los monómeros de JC-1 se multimerizan a una forma de arreglos denominados agregados J. Con la multimerización de JC-1 comienza la emisión de fluorescencia máxima a longitudes de onda más largas, apareciendo en el canal de isocianato de rodamina (RITC) como barras intensas de fluorescencia naranja a roja. La función mitocondrial del espermatozoide también puede evaluarse utilizando colorantes fluorescentes vitales, como el MitoTracker® Green, el cual es fácilmente retenido en las mitocondrias con un alto potencial de membrana mitocondrial, generando un color verde fluorescente en la pieza intermedia del espermatozoide, mientras que la pieza intermedia de los espermatozoides con mitocondrias no funcionales, permanece sin coloración (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Evaluación de la estabilización lipídica de la membrana plasmática

La merocianina 540 es una técnica fluorescente útil en la evaluación de las alteraciones en la organización y arquitectura de los lípidos de la membrana plasmática, ya que se une a membranas que presentan una alta desestabilización lipídica, lo cual puede generarse debido a los cambios de temperatura a los que son sometidas las células espermáticas. Esta técnica ha sido utilizada en semen equino, en cuya evaluación se realiza un conteo de 200 células por eyaculado, encontrándose dos tipos: los espermatozoides fluorescentes indicando que presentan las membranas inestables (positivos para Merocianina 540) y los espermatozoides no fluorescentes con membranas estables (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013)

- Evaluación de la capacitación espermática

La capacitación espermática consiste en una serie de alteraciones fisiológicas y funcionales en el espermatozoide, tales como aumento del calcio intracelular, la

salida del colesterol de la membrana plasmática, el aumento en el pH del semen y la fosforilación de la tirosina. La fosforilación de la tirosina, puede ser evaluada por la detección de residuos de fosfotirosina en el semen, mediante inmunocitoquímica. Esta técnica permite la detección y localización de la proteína, utilizando anticuerpos específicos. En primer lugar un anticuerpo primario reconoce y se une al antígeno a detectar. Con el fin de visualizar la proteína mediante microscopía de fluorescencia se utiliza un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo que es específico para el anticuerpo primario. Como alternativa, el anticuerpo primario puede ser en sí fluorescente. Este tipo de técnica ha sido empleada para evaluar y comparar los procesos de capacitación en el semen equino en fresco y post-descongelación. La medición del flujo de calcio intracelular como indicador de la capacitación, se ha realizado también con la sonda fluorescente flou3-AM. (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

Técnicas de evaluación de la capacidad fertilizante *in vitro*

La penetración del oocito por parte del espermatozoide está determinada por varios factores importantes, como una buena movilidad espermática, la integridad de los receptores proteicos para una correcta unión con la zona pelúcida, y por lo tanto por la generación de una reacción acrosómica y por la unión a la membrana plasmática del oocito. De esta manera, se han desarrollado varias técnicas de penetración *in vitro*, que permiten la evaluación de los parámetros anteriores. Dichas técnicas tienden a ser consideradas como más cercanas al verdadero potencial fertilizante del semen, toda vez que involucran la interacción entre los gametos. Sin embargo, no se debe desconocer su desarrollo en condiciones *in vitro*, que obvian otras múltiples interacciones y efectos propios del tracto reproductivo de la hembra (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Prueba de unión a la zona pelúcida

Evalúa la movilidad de los espermatozoides, la zona de unión y penetración, la capacitación espermática y la reacción del acrosoma. Puede realizarse con partes de la zona pelúcida o con una zona pelúcida completa, evaluando la unión de los espermatozoides a la misma después de un periodo de tiempo. Esta técnica ha sido realizada en equinos y otras especies (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Ensayo Hemizona

El ensayo hemizona (HZA) ha sido desarrollado como una prueba de diagnóstico para predecir el potencial de fecundación de los espermatozoides humanos. Esta técnica se probó con semen equino y se investigó una posible relación entre la fertilidad y el resultado de la HZA en esta especie. Los oocitos equinos son divididos en dos hemizonas, luego de ser denudados (cuando se les quita a los ovocitos de forma mecánica las células del cumulus oophorus) y almacenados en

solución salina a 4 °C hasta su uso. Posteriormente se evalúa la capacidad de unión de los espermatozoides a cada hemizona, pudiendo ser comparados. En este estudio se encontró una relación significativa entre el número de espermatozoides unidos a una hemizona determinada y los índices de fertilidad de cada reproductor, concluyéndose que la HZA puede ser utilizada como un parámetro útil en el análisis de semen equino (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

- Prueba de penetración de oocitos de hamster libres de zona pelúcida

Este ensayo desarrollado por Yanagimachi, evalúa la capacidad de penetración del oocito por los espermatozoides que ya han sufrido la reacción del acrosoma. Se realizó esta prueba para semen equino fresco y almacenado a 4 °C durante 0, 24 y 72 horas. Los resultados indicaron que la prueba puede ser útil para mostrar una disminución en el potencial fertilizante de los espermatozoides equinos que han sido sometidos a un almacenamiento prolongado. Otro estudio demostró que oocitos bovinos libres de zona pelúcida pueden ser útiles para la evaluación *in vitro* de la capacitación y la fertilización de espermatozoides equinos (Restrepo-Betancour *et al.*, 2013).

4.-TRATAMIENTO DEL SEMEN PREVIO A SU CONSERVACIÓN

Para preservar el semen después de su recolección se le agrega un diluyente a diferentes concentraciones. Los diluyentes tienen composiciones diferentes que no afectan la capacidad fertilizante del semen. Es importante tener en cuenta que el éxito del método depende de la calidad inicial de la muestra.

Los diluyentes se agregan al eyaculado libre de gel, previamente templado a 37° C. Los componentes del diluyente proveen al semen substratos metabolizables, pH y presión osmótica adecuada, compuestos que lo protegen contra el choque frío y antibióticos que reducen la proliferación bacteriana (penicilina G 1000-1500 UI/ml; estreptomicina 1000-1500 µg/ml, gentamicina 100-1000 µg/ml, polimixina B 200-1000 UI/ml, ticarcilina 100-1000 µg/ml o ampicilina 100-1000 µg/ml).

El diluyente debe proveer un pH compatible con el semen, entre 6.6 y 7.4 preferentemente ligeramente ácido (6.6-6.8) y una osmolaridad que varíe entre 300 y 400 mosm/l.

La selección del diluyente depende del tipo de inseminación que se usará ya sea con semen fresco, refrigerado o congelado.

Entre los diluyentes que se usan más en equinos son: el Kenney, Equipro, Gent, INRA 96 para refrigerar o con semen fresco; el INRA FREEZE, BOTUCRIO para congelar; el Cushion Fluid para centrifugar etc.

5.- MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN

Para la obtención del semen que se va a utilizar para la inseminación en fresco, refrigerado y congelado se siguen los siguientes pasos en común:

- a. Recolección del eyaculado.
- b. Filtración para eliminar la porción gelatinosa.
- c. Evaluación macroscópica y microscópica del eyaculado.
- d. Recuento en cámara de Neubauer para valorar su concentración espermática.
- e. Dilución del semen con el diluyente.
- f. Evaluación microscópica de la movilidad post dilución.
- g. Proceso particular a cada método.

- Semen fresco

Para conservar el semen sin refrigeración antes de ser utilizado para la inseminación se debe de diluir en diluyentes que pueden ser elaborados por nosotros mismos o comerciales. Para evitar el deterioro rápido de la viabilidad espermática, es conveniente una vez diluida la muestra mantenerla a temperatura (20-22 ° C) hasta el momento de la inseminación.

Si se va a inseminar con semen fresco sin diluir debe emplearse antes de los 30 minutos de haber sido recolectado. Si la inseminación artificial (IA) se realiza hasta 2 horas después de la recolección, se aconseja una dilución de 1:1 o 1:2, generalmente con diluyente a base de leche descremada en polvo. Se recomienda utilizar dosis que contengan como mínimo 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva e inseminar a las yeguas 30 a 90 minutos post-recolección. Este sistema es ideal para sementales que deban servir 2 ó más yeguas por día en plena temporada, o para trabajar con grupos de yeguas con sincronización de las ovulaciones. Con un eyaculado promedio, se pueden inseminar entre 5 y 10 yeguas y los índices de preñez son iguales o levemente superiores (10 %) a la monta natural. (Alonso *et al.*, 2007).

- Semen refrigerado

Con el objeto de preservar la muestra por un período de tiempo mayor, alrededor de 24-48 horas, se puede refrigerar el semen diluido, manteniéndolo a 5° C, mediante una curva de enfriamiento que consiste en la disminución de la temperatura de la muestra a razón de - 0.3° C por minuto. El semen refrigerado pierde 50% de su motilidad inicial, por eso se recomiendan dosis de al menos 200 millones de espermatozoides antes de la refrigeración, estas concentraciones varían según el tipo de inseminación que se vaya a efectuar: inseminación en útero o profunda (en el cuerno) que necesita concentraciones menores de espermatozoides. La muestra diluida debe tener una concentración de 50 millones de espermatozoides por mililitro.

Este proceso reduce la actividad metabólica, retardando los cambios que llevan al envejecimiento de los espermatozoides (“ageing”). El semen así refrigerado no necesita ser pre calentado antes de la inseminación. Para la inseminación se emplea entre 10 y 25 ml de semen refrigerado (dosis de 250 a 500 x 10⁶ espermatozoides con movimiento progresivo). El transporte de semen refrigerado se ha simplificado significativamente gracias al contenedor llamado Equitainer (Hamilton-Thorn Researchs, Danvers M.A.). Este “termo” ha sido diseñado para realizar una curva lenta de disminución de la temperatura que logra 4-5° C en 20-24 horas con una duración máxima de 48 horas, con una disminución de temperatura de -0,3°C/min.

La logística es importante en la implementación de este sistema dado que requiere de una buena sincronización entre el manejo de la/s yegua/s a inseminar y la recolección y envío del semen. Los resultados son muy variables entre sementales, pero respetando los protocolos e inseminando con semen refrigerado durante 24 horas y como máximo 24 hs previas a la ovulación, los índices son muy semejantes a la monta natural. Es uno de los sistemas de mayor crecimiento en la actualidad, permitiendo inclusive el envío de semen entre diferentes continentes, especialmente de aquellos sementales a los cuales, debido a características propias de sus espermatozoides, no es posible congelarles semen, al menos por los métodos convencionales desarrollados hasta el presente.

Con semen refrigerado se recomienda inseminar entre 12 horas y 24 horas antes de la ovulación y volver a inseminar 24 horas después de la primera inseminación.

El semen debe ser mezclado con el diluyente pre-calentado a 37°C, 2 a 5 minutos después de la eyaculación, en una relación 1:1 o 1:2. La concentración final de 25 a 50 x 10⁶ espermatozoides/ml favorece la supervivencia. Una vez diluido, puede ser enfriado de 37°C hasta la temperatura de almacenamiento que varía entre 6°C y 4°C, mediante el uso de unidades de refrigeración (ejemplo: Equitainer R, mantiene la temperatura 4°C a 6°C por 36hs aprox.).

Para la inseminación artificial se emplea entre 10 y 25 ml de semen refrigerado (dosis de 250 a 500 x 10⁶ espermatozoides con movimiento progresivo).

Actualmente, es la técnica más rentable. Entre las dificultades se encuentran la longevidad relativamente corta del semen (24 - 48hs), y no todos los sementales producen semen que toleren la refrigeración. (Alonso *et al.*, 2007)

Efectos de la refrigeración en el semen equino

Se ha determinado que la temperatura óptima para conservar el semen en refrigeración y mantener la motilidad y la fertilidad es de 5°C.

Durante la refrigeración ocurren cambios en la membrana celular, la membrana cambia de su estado líquido cristalino a gel, los lípidos y las proteínas se reorganizan en la membrana y durante esta transición pueden inducirse choques térmicos causando daños. Los espermatozoides son más susceptibles al choque térmico cuando la temperatura se encuentra entre los 19°C y los 8°C porque al

bajar la temperatura hay pérdida de fosfolípidos en la membrana (Battellier *et al.*, 2001). Los espermatozoides con choque térmico presentan las siguientes alteraciones: pérdida rápida de la motilidad, con un movimiento retrógrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática, acompañada de pérdida de los componentes intracelulares. (Amann y Pickett 1987). El metabolismo celular cambia con la temperatura, se reduce de la mitad cuando la temperatura baja cada 10° C. Entonces cuando el semen equino reduce su temperatura que esta a la temperatura corporal de 37°C a 5°C, el metabolismo del semen se reduce aproximadamente al 10% de su nivel original (Loomis y Graham,2008).

La refrigeración baja la actividad metabólica de los espermatozoides y reduce el crecimiento y la actividad de los microbios (Varner *et al.*, 1989).

Grandes cantidades de plasma seminal en semen refrigerado afectan la motilidad y la fertilidad sin embargo se recomienda dejar de 5% a 20% de plasma seminal después de la centrifugación (Jasko *et al.*, 1992). Montas repetidas no sólo afectan la composición y la calidad del eyaculado sino también incrementan la probabilidad de que el semen se contamine de las bacterias de la superficie de los genitales del semental. La contaminación por bacterias del semen refrigerado y guardado durante su transporte afecta la motilidad del semen y la integridad de la membrana, cuando se daña la membrana, tenemos fragmentación de ADN que reduce la fertilidad del semen (Aurich y Spergser, 2007; Price *et al.*, 2008).

Después de 48h de haber conservado el semen en refrigeración podemos tener una fragmentación de ADN significativa, sin embargo al templar el semen a 37° C puede inducir también la fragmentación de ADN ya que la conservación en refrigeración induce la apoptosis vía el estrés oxidativo (López-Fernández *et al.*, 1989).

La refrigeración incrementa la peroxidación de los lípidos de la pieza media del espermatozoide conservado a 5°C a partir de las 24 h a las 48h. (Ball y Vo, 2002; Raphael *et al.*, 2008). Causando una pérdida de motilidad y de fertilización. (Aurich, 2005). El semen refrigerado presenta daño al ADN por el estrés oxidativo (Wnuka *et al.*, 2010) o por choque térmico.

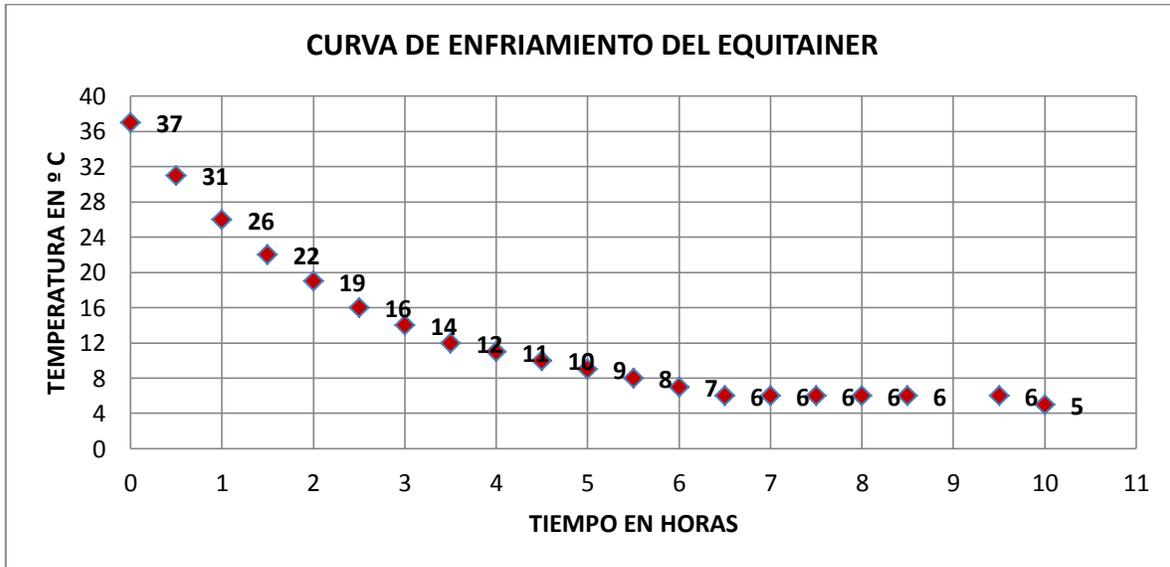
En los caballos se reportó que la desnaturalización de la cromatina es más alta en el semen de los sementales subfértiles que en los fértiles. (Loomis y Graham, 2008).

Para mantener el semen en refrigeración, el semen fresco debe diluirse con diluyentes para conservarlo de 24h hasta 48h. Pueden usarse diluyentes comerciales como el Kenney, el INRA 96, etc.

Estos diluyentes pueden contener o no, antibióticos o antioxidantes: pueden usarse a diferentes diluciones de semen/diluyente según la concentración espermática deseada.

En la industria equina, la refrigeración del semen para envío se ha convertido en un método muy usado ya que almacenado correctamente a 5°C durante 24horas mantiene su fertilidad cercana a la fertilidad del semen fresco. (Aurich, 2005).

Para mandar el semen refrigerado se puede utilizar el Equitainer que permite mantener la calidad del semen sin que haya cambios drásticos en la temperatura. (Hamilton-Thorn Research, Danvers, MA, USA). El Equitainer es un contenedor para transportar semen refrigerado que permite el enfriamiento inicial lento (a 0,3 °C/min) de una temperatura inicial de 37°C hasta llegar a una temperatura final de 5°C, funciona por "conducción térmica," en el que se transfiere calor entre dos objetos sólidos en contacto unos con otros. Tarda aproximadamente 10 horas para llegar a su temperatura interna final de 5 ° C (42°F).



Las ventajas de la inseminación con semen congelado son: 1) es mucho más económico, práctico, y seguro transportar un termo con Nitrógeno líquido con grandes cantidades de dosis para inseminar cientos de yeguas que un semental, 2) reducción de los costos de servicios, transporte de las yeguas, seguros, estrés, riesgo de contraer enfermedades, accidentes en yeguas, sementales y manejadores etc. 3) La "estación reproductiva" del semental puede continuar mientras éste se encuentra participando en torneos, concursos, exposiciones, convaleciendo de enfermedades, o eventualmente, años después de su muerte, 4) reducción del uso de sementales genéticamente inferiores, 5) conservación y accesibilidad de semen de sementales genéticamente superiores, 6) preservación del semen en Nitrógeno líquido (-196 C) por un número indefinido de años.

Las desventajas son el costo del equipo y que el manejo del semen necesita de un personal capacitado.

Los protocolos de congelación no han establecido una curva ideal de congelación, probablemente debido a la composición extremadamente variable del diluyente, y a los tipos y concentración de los crioprotectores. Esta técnica puede realizarse de forma manual o con congeladores automáticos.

El semen colectado y diluido se centrifuga a 2500rpm durante 12mn. Luego se resuspende con un diluyente para congelación y se empajillan en pajillas de 0.5ml. o de 0.25ml. Las pajillas se refrigeran a 5°C durante 30min (tiempo de equilibrio). Después se posicionan horizontalmente dentro de una nevera de icopor a una distancia de 4cm por encima del nitrógeno líquido ubicado en el fondo de la nevera, estos vapores están a una temperatura de -160°C, durante 10min para ser congeladas paulatinamente antes de ser sumergidas al nitrógeno líquido. Después las pajillas se colocan en canastillas y se almacenan en el termo con nitrógeno líquido.

Después para verificar la viabilidad de las pajillas, se ponen en baño María a 37°C, para descongelarlas y verificar su viabilidad. (Alonso *et al.*, 2007)

6.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EQUINOS

La inseminación debe ser realizada durante el estro, lo más próximo posible a la ovulación, con celo natural o inducido con análogos de la prostaglandina.

La exploración rectal mediante ecografía de ovarios y útero de la yegua, repetida durante el tiempo del celo, es necesaria para determinar el momento más indicado de la inseminación artificial, valorando el aspecto del folículo preovulatorio, midiendo su tamaño y forma, grosor de sus paredes y ecogenicidad del sedimento del líquido folicular. Cuando se emplea esperma congelado, se es aún más estricto en la selección y manejo de la yegua, llegando a someterla a exploraciones ecográficas seriadas cada seis horas.

Además, el momento para realizar la inseminación artificial dependerá del tipo de esperma. Con refrigerado se realiza normalmente por exploración rectal ecográfica del aparato reproductor para identificar en un ovario la presencia de un folículo

preovulatorio (FP), de tal manera que si está en celo y/o tiene un FP se insemina por primera vez y se repite a las 24 horas hasta que termine el celo (24hs antes a 12hs después de la ovulación). El porcentaje medio de fertilidad obtenido es del 60% o mayor. Sin embargo, cuando se quiere inseminar con espermatozoides congelados conviene que la dosis se deposite en el útero entre las 6-8 horas anteriores a la ovulación o las 6 posteriores (12hs antes a 12hs después de la ovulación). Para poder predecir el momento de la misma es imprescindible el examen ecográfico seriado del ovario activo. La fertilidad del congelado varía mucho entre donantes (20-100%) y está influido por la hembra y la técnica de inseminación.

- Técnica de Inseminación en equinos

Preparación de la yegua: debe ser inmovilizada, la cola vendada y desviada. La región perineal debe limpiarse y secarse.

Preparación del semen: El semen fresco, refrigerado o descongelado se coloca en una jeringa con émbolo plástico (la goma puede ser tóxica para los espermatozoides). La jeringa es fijada a una pipeta de inseminación artificial (IA). Para semen congelado se coloca la pajilla en el catéter de inseminación.

El operador introduce una mano en la vagina, la cual conduce y protege la pipeta, y la otra mano colocada vía rectal sirve como guía o utilizando el transductor rectal del ultrasonido

La mano con guante y lubricada se introduce (luego de separar los labios vulvares) a través del vestíbulo; en la extremidad craneal de la vagina se localiza el cérvix, se introduce el dedo índice, y sobre éste se dirige la pipeta hacia el interior del útero, depositando la dosis seminal en el cuerpo, (llamada inseminación intrauterina) o preferentemente en el cuerno del útero. (Llamada inseminación intrauterina profunda).

Tradicionalmente, al inseminar se deja la dosis de semen en el cuerpo del útero. Sin embargo, actualmente, la tendencia es realizar la inseminación intrauterina profunda, porque permite incrementar los porcentajes de fertilidad y reducir la concentración de espermatozoides de la dosis. Esta variante está más indicada cuando se emplea espermatozoides congelados (con menos capacidad fecundante).

Se recomienda inseminar solo yeguas con muy buena condición corporal, bien alimentadas, realizar los chequeos periódicos conforme al protocolo, verificar que el útero tenga algo de edema y crecimiento endometrial, inseminar a la yegua cuando el folículo se encuentre entre 35mm y 42 mm. Checar siempre ovulación y a los 15 días realizar la ecografía para hacer el diagnóstico de gestación.

XI ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL A TRAVÉS DEL SEMEN EQUINO EN LAS INSEMINACIONES ARTIFICIALES

1. VIRALES

- ARTERITIS VIRAL EQUINA (AVE)

El agente etiológico es denominado “Virus de la Arteritis Viral Equina”, debido a su característica producción de inflamación de la capa muscular de las arterias en la fase aguda de la enfermedad. Perteneció a la familia *Arteriviridae* (género *Arterivirus*, orden *Nidovirales*), que incluye el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) entre otros.

Es una enfermedad viral infecciosa de los équidos (caballos, asnos y mulas) que puede ser transmitida por vía respiratoria y a través del semen.

Las infecciones son subclínicas y solo ocasionalmente ocurren brotes clínicos de la enfermedad caracterizados por un síndrome tipo influenza en adultos, aborto en yeguas preñadas y neumonía intersticial aguda en potrillos. Es un virus poco resistente a condiciones ambientales. Es sensible a la luz solar, baja humedad y altas temperaturas y a desinfectantes y solventes de lípidos. De todos modos debe destacarse su extrema resistencia a las bajas temperaturas dado que sobrevive en semen refrigerado a +4°C y, por años, en semen congelado a -196°C, por lo que el semen congelado es epidemiológicamente punto crítico en la cadena de transmisión de la enfermedad como ha sido demostrado claramente en el caso de Argentina. (SENASA, 2011)

La enfermedad está presente en Norte y Sud América, Europa, Australia, África y Asia, con una gran variación de seroprevalencia entre países, y dentro de los países, en sub-poblaciones de caballos.

En general, el número de sementales infectados portadores-eliminadores (“*carriers*”) determina la prevalencia de la infección en las poblaciones equinas. Este estadio, que ocurre en sementales con infecciones crónicas (entre el 10 y 70% de los expuestos eliminan virus constantemente por semen) constituye la reserva de la enfermedad que se transmite a través del semen a yeguas susceptibles tanto por monta natural como la inseminación artificial. A su vez estas yeguas (y también los sementales) pueden transmitirla por vía aerógena a otros individuos, constituyendo otra manera muy importante (y en general desapercibida) de perpetuar la enfermedad. El semen refrigerado y congelado de sementales eliminadores constituye una fuente considerable de transmisión, en especial en países donde los sistemas de control oficiales en equinos son nulos o muy deficientes. El incremento de programas de inseminación artificial asociado a la transferencia embrionaria (TE), en especial en el continente Americano, con el movimiento permanente de yeguas donantes y receptoras, también ha jugado un rol (Broaddus *et al.*, 2011) (Go *et al.*, 2011) (Morrell *et al.*, 2006).

- EXANTEMA COITAL EQUINO (ECE)

Es una enfermedad altamente contagiosa, no sistémica que se transmite a través del coito y afecta los genitales externos de los equinos. Se caracteriza por la presencia de lesiones vesiculares y/o ulcerativas en la mucosa del pene en el semental y en la vulva y mucosa vaginal en la yegua.

El agente causal del ECE es herpesvirus equino 3 (EHV-3), orden Herpesvirales, Familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*.

La infección por EHV-3 puede ocurrir por vía directa (contacto cutáneo) durante el coito o por la transferencia de virus a partir de objetos contaminados (endoscopios, guantes, ecógrafos). A pesar de que la inseminación artificial ha minimizado el impacto de los brotes de ECE durante las últimas décadas, EHV-3 puede contaminar un eyaculado durante la recolección de semen a través del contacto del pene con la vagina artificial (Barrandeguy *et al.*, 2010 a.b; Barrandeguy, 2010).

2.- BACTERIANAS

- METRITIS CONTAGIOSA EQUINA (MCE)

Es una enfermedad bacteriana, infecciosa, no sistémica, característicamente de transmisión sexual a través de la monta natural, inseminación artificial o de material utilizado en exámenes reproductivos, causada por *Taylorella equigenitalis* y que sólo afecta a los caballos.

Los signos clínicos solo pueden ocurrir en las yeguas, pero no en los sementales en los cuales la infección es asintomática. Las yeguas infectadas pueden desarrollar una endometritis aguda con descarga vaginal 2 a 7 días post monta o inseminación artificial o directamente no presentar ningún signo clínico. El acortamiento del diestro y la infertilidad temporaria son frecuentes en las yeguas afectadas. El agente persiste en la fosa del clítoris. Se describen casos en que las yeguas infectadas pueden preñarse y transmitir la infección a los potrillos “*in utero*” o más probablemente, durante el parto. Los sementales adquieren la infección por monta natural de yeguas infectadas (con o sin síntomas) y el agente permanece en el esmegma del prepucio y/o la fosa uretral transformándolo en un portador asintomático (*carrier*) que puede transmitirlo por las mismas vías a otras yeguas (Kamada *et al.*, 1984).

- INFECCIONES BACTERIANAS EQUINAS

Las especies identificadas como patógenas primarias de transmisión mecánica directa o a través del semen son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus* (Drenkard, 2003) (Kenney *et al* 1992).

3. PROTOZOARIAS

- DURINA

Es una enfermedad parasitaria exclusiva de los equinos que se transmite por vía sexual, con un alto índice de mortalidad. Se han reportado infecciones naturales solamente en caballos y burros. Produce lesiones genitales, cutáneas, en el sistema nervioso y debilitamiento general de los animales afectados predisponiéndolos a contraer otras enfermedades.

El agente causal es el *Trypanosoma equiperdum*. Se transmite por contacto directo durante el coito y no se encuentra involucrado ningún vector en la transmisión. Este protozooario tiene tropismo por la mucosa genital y no sobrevive por períodos prolongados fuera de su huésped.

Esta enfermedad es endémica en África, Asia y América Central y del Sur. Tiene baja prevalencia en la región sureste de Europa. La mortalidad es del 50% en casos agudos, pero se ha reportado hasta un 100%. Los animales en edad reproductiva se encuentran en riesgo en zonas endémicas.

Los animales infectados pero clínicamente asintomáticos actúan como portadores y son el reservorio de la enfermedad. Los sementales no infectados pueden actuar como portadores mecánicos luego de cubrir una yegua infectada.

La enfermedad se transmite a través del coito y los animales presentan un cuadro clínico característico en la primera semana y hasta 3 meses post infección (período de incubación). La multiplicación del parásito produce fragilidad en los vasos sanguíneos que da como resultado lesiones edematosas cutáneas características. Se observa un edema no doloroso y frío a nivel de vulva y vagina en la yegua y en la zona del pene, prepucio y escroto en sementales. Estos síntomas son acompañados por la presencia de una colecta uretral mucoide o mucopurulenta y leve hipertermia. La libido no se encuentra afectada pero la introducción del pene en la vagina es dificultosa y en algunos casos imposible debido al edema pudiendo complicarse con parafimosis y parálisis del pene.

Las placas cutáneas redondas y sobre elevadas en forma de monedas (“duros”, en referencia a la denominación de la ex moneda española, de donde proviene el nombre de la enfermedad), miden de 2 a 10 cm de diámetro y se consideran patognomónicas.

Posterior a la fase cutánea sobreviene un síndrome neurológico con incoordinación y marcha titubeante a nivel de miembros posteriores, emaciación y eventualmente parálisis y muerte. En caso de preñez, se produce aborto. El curso de la enfermedad es, en general de 1 a 2 meses pero puede durar hasta 2 a 4 años. El 50% de los animales afectados mueren de enfermedad aguda en 6 a 8 semanas. Se ha reportado mortalidad de hasta un 100%.

El diagnóstico clínico se basa en la presencia de lesiones características a nivel de la piel de los genitales.

El test de fijación de complemento para Durina es el recomendado y requerido por la Organización Internacional para las epizootias, dependiente de Naciones Unidas, para el transporte internacional de equinos (OIE, 2001). (Morresey, 2011).

4.- OTRAS INFECCIONES QUE SE TRANSMITEN A TRAVÉS DEL SEMEN

- HERPES VIRUS EQUINO-1 (HVE1)

Virus de la familia *Herpesviridae* son responsables de infecciones genitales y de transmisión sexual a través del semen causando alteración de algunos de los parámetros seminales e infertilidad. En equinos se ha descrito la presencia de Herpes Virus Equino 1 en semen, determinado por PCR (prueba de la reacción en cadena de la polimerasa) de sementales naturalmente infectados y en fase clínica de enfermedad respiratoria.

Se postula que cierta afinidad del HVE-1 por tejido reproductivo podría estar involucrada en la presencia en el tracto de los sementales y en semen como así también en endometrio y placenta en las yeguas (Tibary, 2005).

- BABESIOSIS (PIROPLASMOSIS)

La principal forma de transmisión de la enfermedad es por medio de garrapatas, pero ha sido documentada la transmisión mecánica directa, en especial de *Babesia equi*, por lo que se postula que debería considerarse (si bien no hay evidencia experimental), como posible vía de contaminación, el semen contaminado con sangre (hemospermia) de un semental infectado (Tibary, 2005).

XII.-LEGISLACIÓN SOBRE EL MANEJO DEL SEMEN EQUINO

Actualmente los procedimientos del manejo del semen equino están controlados por una normatividad en la Comunidad Europea y de igual manera en nuestro país.

La decisión de la comisión Europea del 26 de agosto de 2010 dictaminó la Directiva 92/65/CEE., sobre la importación en la Unión de esperma, óvulos y embriones de animales de la especie equina en lo que se refiere a las listas de centros de recogida y almacenamiento de esperma y de equipos de recogida y producción de embriones y a los requisitos de certificación.

El donante de semen no puede padecer ni ser portador de: Durina, Muermo, Encefalomiélitis equina (en todas sus variedades incluida la Encefalitis Equina Venezolana (VEE), Anemia infecciosa, Rabia, Carbunco bacteridiano, Peste equina, Estomatitis vesiculosa.

Esta normativa entre otras cosas precisa como deben de realizarse las pruebas de laboratorio:

- Detección de la anemia infecciosa equina: prueba de inmunodifusión en agar-agar llamada prueba de Coggins, con resultado negativo.
- Detección de la arteritis víral equina: prueba de seroneutralización completada en caso de resultado positivo con un examen virológico del esperma total con un resultado negativo.
- Detección de la metritis contagiosa de los équidos: aislamiento de *Taylorella equigenitalis* en un control efectuado a muestras tomadas a nivel de la fosa uretral y de líquido preeyaculatorio con resultado negativo en todos los casos.

El resultado de estas pruebas deberá ser certificado por un laboratorio autorizado.

Los sementales durante su estancia en el centro no pueden hacer monta natural, ni tampoco haber tenido montas naturales los 60 días anteriores a su ingreso al centro.

a) También dictamina en caso de que el semen se colecte para destinarlo al comercio en estado fresco o refrigerado:

1.- Si los sementales donantes permanecen de manera ininterrumpida en el centro de recolección durante los treinta días anteriores a la primera colección de semen y durante el periodo de colección y ningún équido estar en contacto directo con équidos de estado sanitario inferior, las pruebas de laboratorio necesarias se realizarán al menos catorce días después del inicio del periodo de permanencia mencionado y como mínimo, una vez al año al inicio del periodo de apareamiento.

2.- Si los sementales donantes no permanecen de manera ininterrumpida en el centro de colección u otros équidos de este centro están en contacto directo con

équidos de estado sanitario inferior, las pruebas de laboratorio se realizaran dentro de los catorce días del período de apareamiento, además, la prueba de Coggins para la detección de la anemia infecciosa equina se deberá repetir con un intervalo no superior a 120 días durante el período de recolección de semen, la prueba de seroneutralización para la detección de la arteritis viral equina se hará como máximo 30 días antes de cada recolección de semen a menos que se confirme mediante una prueba de aislamiento del virus que se habrá de realizar anualmente, que un semental seropositivo a la arteritis infecciosa equina no sea excretor.

b) En el caso de que el semen se obtenga para destinarlo al comercio en estado congelado, se realizará el programa contemplado al apartado a) o, alternativamente, las pruebas de laboratorio durante los 30 días de almacenamiento obligatorio del semen y al menos catorce días después de la colección del semen, independientemente que el semental se haya mantenido o no en el mismo lugar.

Si alguno de los exámenes contemplados fuese positivo, el animal se habrá de aislar y su semen colectado a partir de la fecha del último resultado negativo, no se podrá comercializar. Lo mismo pasará con el semen de los otros animales que permanezcan al centro de colección a partir de la fecha en la que el examen haya dado positivo. Solo se podrá continuar con los intercambios cuando se haya reestablecido la situación sanitaria.

El semen destinado al intercambio intracomunitario, que provenga de équidos registrados o no, tendrá que ir acompañado al momento de su expedición de un certificado sanitario para el comercio de la especie equina (anexo de la Decisión 95/307/CE).(ODOUE.2010)

En nuestro país el 14 de junio de 1995, se publicó en el Diario Oficial de la Federación, el Proyecto de norma Oficial Mexicana NOM-032-Z00-1995, denominada "Proceso zosanitario del semen de animales domésticos".

Dicha norma se modifico y se estableció como norma oficial mexicana:

NOM:-027-Z00-1995.PROCESO ZOOSANITARIO DEL SEMEN DE

ANIMALES DOMÉSTICOS. Donde en el apéndice E se refiere a la especie equina.

En dicha norma especifica:

- que los animales deben cumplir con otra norma la NOM.019-ZOO-1994. Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus spp.*
- los requisitos que deben cumplir los centros de colección de semen (CEPROSEM),
- los requisitos que los sementales necesitan para ingresar a estos centros:

- estar vacunados contra Influenza Equina, Rinoneumonitis, Encefalitis Equina Venezolana
- Presentar prueba negativa a Anemia Infecciosa Equina (Coggins), realizada dentro de los últimos 6 meses previos al ingreso al CEPROSEM.
- Que el semental haya sido tratado contra parásitos internos entre los 7 y 60 días previos a su ingreso al CEPROSEM,
- Que el semental no haya dado monta natural durante los 30 días previos a la entrada al CEPROSEM.

También la NOM:-027-Z00-1995 especifica como deben estar contruidos los CEPROSEM, su bioseguridad, el manejo del semen. (Quijano G. 2011).

XIII MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL

Material biológico:

La presente investigación se realizó en la temporada reproductiva (de abril a septiembre) y se utilizó semen fresco de 6 caballos, los cuales se encontraban en dos localidades diferentes:

- Tres caballos pertenecientes a la Policía Montada de la Cd de México (UPM), de raza Azteca, de 6, 9 y 19 años de edad.
- Tres caballos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas de Cd Victoria, Tamaulipas (UAT), de raza Cuarto de Milla de 3.5, 5 y 18 años de edad.

2.- MÉTODOS:

Práctica experimental y valoración de la viabilidad funcional del espermatozoide equino de acuerdo a los métodos tradicionales y avanzados, efectuada en seis sementales.

Los datos de este estudio se analizaron mediante análisis estadísticos paramétricos y no paramétricos.

Las pruebas convencionales (motilidad, viabilidad, reacción acrosomal, se analizaron mediante un diseño de distribución de muestreo de la media con el análisis de varianza (ANOVA)

Modelo ANOVA para efecto de dilución de diluyente

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3$ (dilución)

$j = 1, 2, 3, 4$ (montas)

Y_{ij} = la observación j en la concentración del diluyente i

μ = media general (media sin tomar en cuenta la concentración)

α_i = efecto de la concentración i del diluyente $i = \mu - \mu_i$

μ_i = la media de la concentración i del diluyente i

ϵ_{ij} = error aleatorio

Modelo ANOVA para efecto de tiempo

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, 4$ (tiempo)

$j=1, 2, 3, 4$ (montas)

Y_{ij} = la observación j en el tiempo i

μ = media general

α = efecto del tiempo $i = \mu - \mu_i$

μ_i = la media del tiempo

ϵ_{ij} = error aleatorio

Para las pruebas avanzadas se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 24 analizando los datos de la fragmentación de ADN mediante el análisis estadístico no paramétrico de supervivencia con el método de Kaplan Meier, las gráficas de supervivencia resultantes se compararon mediante el test del Log-Rank, con una significancia de $P= 0.05$

Para comparar los parámetros de motilidad, viabilidad y fragmentación se evaluó con regresión lineal con Excel.

Con el análisis de varianza (ANOVA) se analizó:

- que concentración de diluyente tuvo mejores resultados en las pruebas de motilidad, viabilidad y reacción acrosomal.
- la evolución del índice de fragmentación del ADN en los tiempos estipulados en el protocolo de este estudio.

Se compararon los resultados de motilidad, viabilidad con los de fragmentación de ADN.

Se compararon los resultados de las pruebas de motilidad, viabilidad y reacción acrosomal entre los caballos de cada grupo y en conjunto; entre los caballos jóvenes y los caballos viejos.

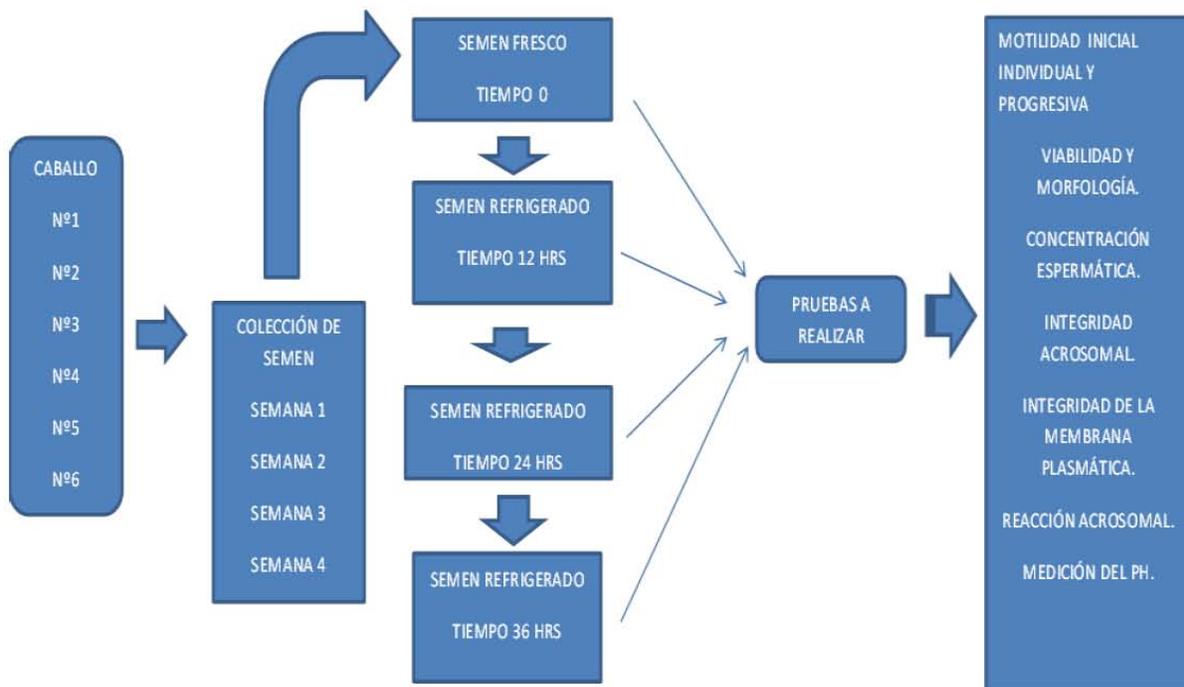
Con el análisis de supervivencia con el método de Kaplan Meier se analizaron las diferencias de la evolución de la fragmentación del ADN espermático entre los caballos de cada grupo y en conjunto.

El método de Kaplan-Meier es un método no paramétrico, con muy pocas restricciones; de hecho, lo único que supone es que los sujetos censurados se habrían comportado del mismo modo que los seguidos hasta que se produjo el evento (lo que se conoce por "censura no informativa").

Para aplicar este método se ordenan de menor a mayor todos los tiempos de supervivencia observados, anotando para cada uno de ellos el número de muertes y censuras producidas. Para cada periodo de tiempo se calcula la probabilidad de sobrevivir, y la función de Kaplan-Meier es "la probabilidad de supervivencia individual acumulada a lo largo del tiempo".

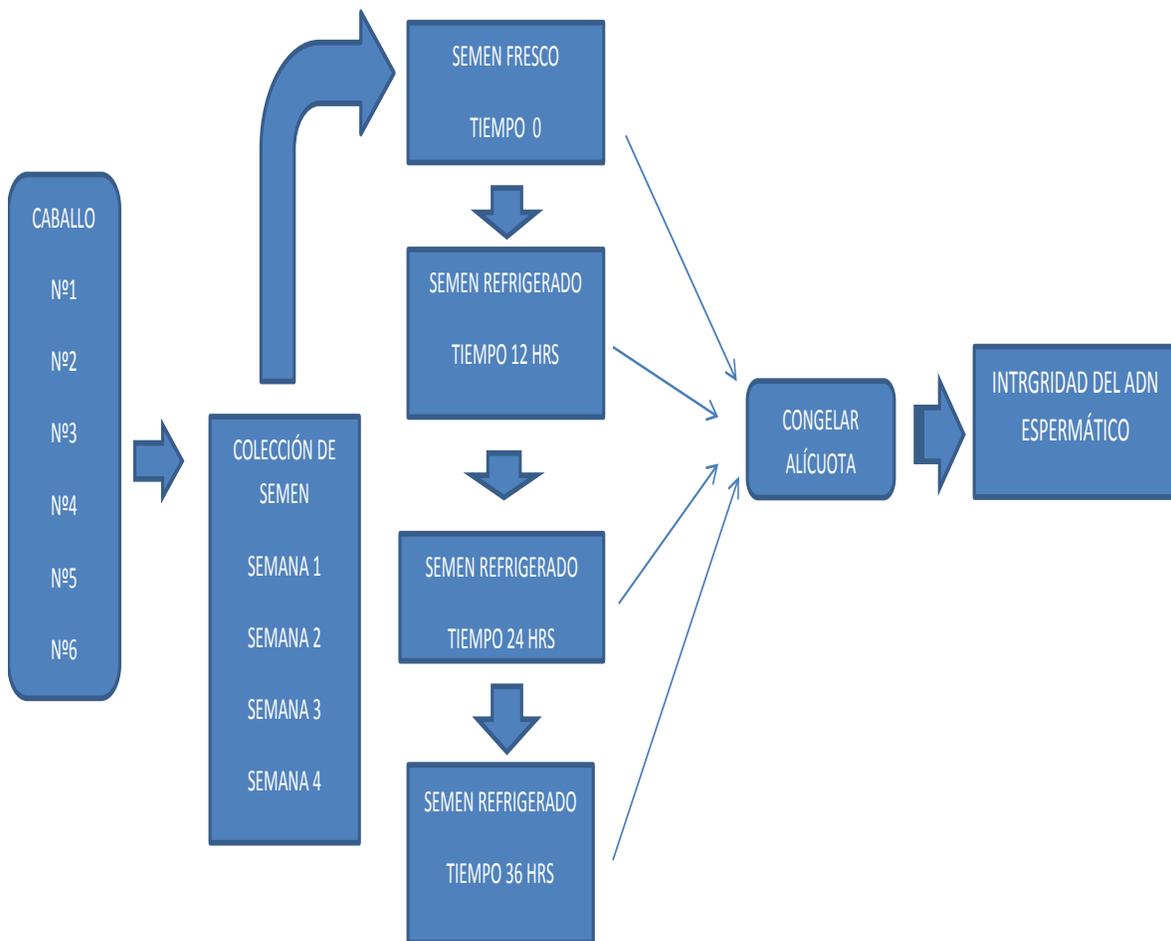
DISEÑO DEL EXPERIMENTO:

➤ PARÁMETROS CONVENCIONALES



➤ **PARÁMETROS AVANZADOS.-**

Evaluación de la integridad del ADN espermático con la prueba de la dispersión de la cromatina con el kit de Hallomax para obtener el índice de dispersión de la fragmentación del ADN (DFI) y el índice de supervivencia.



- Preparación de las yeguas y de los sementales:

Para la colección del semen equino se utilizaron yeguas que se encontraban en celo natural. Se lavaron los genitales externos de las yeguas y de los sementales con agua tibia a 37°C. sin jabón en cada monta. Para cada monta a la yegua se le vendó la cola antes colectar el semen y se le colocó el tira pie para inmovilizarla y para que no lastimara al semental.

- Preparación de la vagina artificial tipo Missouri:

La vagina se lavó con jabón neutro para limpiarla entre cada monta colocándole posteriormente su funda de piel. La camisa de plástico o liner se deslizó en el interior de la vagina; se fijó al exterior de ella con un elástico por el lado ancho y por el otro lado se conectó al biberón colector que ya tenía en el interior el filtro para separar el gel o plasma seminal del eyaculado. El agua con que se llenó la cámara de agua tenía una temperatura de 50-52°C, de manera que la temperatura interna fuera de 42-45° C. La cantidad de agua que se vertió en la vagina fue la adecuada para que se acomodara el pene del semental y que la presión fuera uniforme en toda la vagina artificial y para que no dificultara la penetración y la erección.

La superficie interna de la camisa de plástico o liner se lubricó con un gel no espermicida. El eyaculado se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura corporal hasta su proceso en el laboratorio.

- Recolección del semen

El operador encargado de colectar el semen se colocó del lado izquierdo junto con el personal que manejó al semental. Estando muy atento a las reacciones tanto de la hembra como las del macho.

Cuando el macho logró la erección, se le permitió montar a la yegua. El operador desvió el pene y introdujo la vagina artificial al semental.

Con la mano izquierda se sostuvo la vagina artificial apoyándola contra la yegua y la mano derecha se colocó ventral al pene con el objeto de palpar las pulsaciones asociadas con la eyaculación. La palpación de estas pulsaciones junto con el flameo de la cola (movimiento de bandera) evidenciaron que la eyaculación se había llevado a cabo. Inmediatamente después que se quitó la vagina artificial del pene del semental, la vagina artificial se colocó en posición vertical y se abrió la válvula del agua para que saliera y dejara que el semen que había quedado en porciones altas de la vagina drenara hacia el biberón colector.

- Manejo del semen:

De cada uno de los sementales se obtuvo una muestra inicial de semen, la calidad seminal se evaluó de inmediato (tiempo cero). Luego el semen después de haber sido colectado y refrigerado en el Equitainer, fue evaluado sucesivamente sin ser incubado a las 12 horas (T12), a las 24 horas (T24) y a las 36 horas (T36). Se utilizó un diluyente tipo Kenney con tres diluciones diferentes. (Fórmula Kenney: Leche descremada Svelty 2.4g, Glucosa 4.9 g, Agua Mili q 92ml). En el tiempo cero se usó el semen fresco y para las 12,24 y 36 horas se usó una dilución de 1:1, 1:2, 1:3 (semen/diluyente).(D1:1:1, D2:1:2, D3:1:3.) Se realizaron 4 colectas por semental con un intervalo de una semana entre cada colecta.

Para cada muestra se realizaron pruebas convencionales evaluándose: motilidad, viabilidad, morfología, concentración espermática, integridad acrosomal, integridad de la membrana plasmática, reacción acrosomal, medición del pH.

Paralelamente a lo anterior se tomó una alícuota de las muestras colectadas y refrigeradas a los diferentes tiempos y se congelaron para evaluar posteriormente la fragmentación del ADN. Para preparar las muestras se utilizó el kit de Halomax para equinos y se evaluaron con el microscopio óptico y con la tinción de Diff Quik. La tinción de Diff-Quik es una técnica sencilla y rápida compuesta por un fijador (metanol), un colorante aniónico ácido (eosina) que tiñe positivamente las proteínas básicas de color rojo, y por una tiazina (azul de metileno o sus derivados) que tiñe el ADN de azul.

3.-PARA EFECTUAR EL ESPERMIOGRAMA SE UTILIZARON LAS SIGUIENTES TÉCNICAS:

EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

- **Motilidad.**- Se tomaron 10µl de semen fresco de cada muestra y se colocaron en un porta objetos previamente calentado a 37°C y se observó con en el microscopio óptico con 400 aumentos.

- **Volumen.**- Con una probeta graduada de vidrio se midió el total en ml del semen colectado sin fracción gelatinosa

- **pH.**- Se midió con un potenciómetro la muestra recién colectada.

- **Color.**

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

- **Motilidad.**- Se tomaron 10µl de semen fresco de cada muestra y se colocaron en un porta objetos previamente calentado a 37°C y se observó con en el microscopio óptico con 400 aumentos.

- **Concentración espermática.**- Las muestras se prepararon de la siguiente forma: en un vial se puso 10µl de semen fresco más 90 µl de Glutaraldehído salino bufferado. De esta mezcla se tomó 10µl y se colocó en la cámara de Neubauer, para observarlo en el microscopio óptico y contar los espermatozoides.

- **Morfología y viabilidad.**- Se utilizó la tinción de Eosina/Nigrosina ya preparada. Se tomó 10µl de la muestra y se mezcló con 10µl de la tinción y se realizó un frotis. Dicha preparación se observó en el microscopio óptico con 400 aumentos y 1000 aumentos con el aceite de inmersión

- **Integridad de la membrana.**- Se utilizó la misma preparación que la de morfología y viabilidad y se observó al microscopio óptico.

- **Reacción acrosomal.**- Se utilizó la tinción de Azul brillante de Coomassie y se observó al microscopio óptico con 1000 aumentos con aceite de inmersión.

(Fórmula azul brillante de Coomassie: Azul de Coomassie SIGMA 0.625g, Metanol 112.5ml, Ácido acético 25ml, Agua bidestilada 250ml.).

La muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 3 min, se quitó el sobrenadante y se reconstituyó con 100 µl de Cloruro de Amonio. En un vial se pusieron 16µl de la mezcla anterior se le adicionaron 16µl de Glutaraldehído salino bufferado y se esperó 10mn. De esta segunda mezcla se tomaron 10µl que se colocaron en un portaobjetos con un cubre y se dejó secar. Después la laminilla se sumergió durante 20mn en un vaso de Coplin con la tinción de Azul Brillante de Coomssie. Se sacó y se dejó secar, luego se lavó con agua destilada para proceder a su lectura. (Gutiérrez-Pérez *et al.*, 2009).

- **Fragmentación de ADN.**- La integridad del ADN espermático se evaluó con la prueba de la dispersión de la cromatina con un kit específico para equinos (Halomax, Halotech DNA), se observó con 1000 aumentos en el microscopio óptico y se utilizó la tinción de Diff Quik.

El fundamento de la técnica de la dispersión de la cromatina es que los espermatozoides intactos se sumergen en una matriz de agarosa en una laminilla y se tratan con una solución ácida desnaturalizante. Las membranas y proteínas se remueven usando una solución de lisis y posteriormente son teñidas para ser observadas en el microscopio óptico y con aceite de inmersión.

XIV RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CONVENCIONALES Y AVANZADAS

En la Policía Montada de la Cd. de México (UPM) se colectó semen de tres caballos escogidos al azar, de 7, 9 y 19 años de edad, con una temperatura ambiental entre 20°C a 24°C, bajo las mismas condiciones de alojamiento, de alimentación (grano y pacas de avena) y dando montas regularmente.

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT) se colectó el semen de tres sementales de 3.5, 5 y 18 años, a una temperatura ambiente oscilando entre los 39°C y los 48°C, bajo las mismas condiciones de alojamiento (caballerizas y corrales) y de alimentación (grano, pacas de avena y pastura) y sin dar montas regularmente. Debido a la alta temperatura ambiental se debió cambiar y congelar las latas del Equitainer frecuentemente para conservar las muestras de semen al interior del Equitainer. Los eyaculados de los caballos presentaron un volumen, pH y un color normal a la hora de la colecta.

Se evaluaron las muestras de semen con los parámetros convencionales en los tiempos acordados por el protocolo. El promedio de los valores de las cuatro montas de motilidad y de viabilidad disminuyeron, mientras que el promedio de los valores de las cuatro montas de la reacción acrosomal aumentó conforme transcurrió el tiempo del estudio.

La motilidad y la viabilidad de los seis sementales fueron decreciendo progresivamente con el descenso de la temperatura y con el aumento del tiempo de refrigeración.

El caballo C5 fue colectado a una temperatura ambiente superior a los 40°C, los valores de sus parámetros convencionales fueron bajos. El Equitainer no mantuvo sus latas congeladas durante el tiempo del estudio por lo que tuvieron que cambiarse varias veces. Es probable que el semen de este caballo de 18 años no soportara los cambios térmicos a los cuales fue expuesto desde su colecta hasta su envasado en el Equitainer y/o debido a su edad.

El promedio de los valores de la fragmentación del ADN de las cuatro montas de los caballos C1, C2, C3, C4, C6 se incrementó conforme transcurrió el tiempo de la evaluación, mientras que el promedio las cuatro montas de los parámetros de viabilidad y de motilidad descendieron. Demostrando que no existe correlación entre los resultados de las pruebas convencionales de motilidad y viabilidad con los resultados de fragmentación de ADN de la prueba de dispersión de la cromatina.

MOTILIDAD

En el grupo UPM el caballo C1 (9 años) tuvo los valores más altos en sus parámetros de motilidad y el que tuvo los valores más bajos fue el caballo C2 (19 años).

En el grupo UAT el caballo C4 (5 años) tuvo los valores más altos en sus parámetros de motilidad y el que tuvo los valores más bajos fue el caballo C5 (18 años).

Los caballos jóvenes tanto de la UPM como los de la UAT presentaron mejor motilidad que los caballos viejos. (C1 (9años), C3 (7 años), C4 (5años),C6 (3.5 años)).

El caballo que tuvo los mejores resultados en sus valores de motilidad fue el C4 (5años) de la UAT.

VIABILIDAD

En el grupo UPM el caballo C1 (9 años) tuvo los valores más altos en sus parámetros de viabilidad y el que tuvo los valores más bajos fue el C2 (19 años).

En el grupo UAT el caballo C5 (5 años) tuvo los valores más altos en sus parámetros de viabilidad y el que tuvo los valores más bajos fue el C5 (18 años).

Los caballos jóvenes tanto de la UPM como los de la UAT presentaron mejor viabilidad que los caballos viejos. (C1 (9años), C3 (7 años),C4 (5años),C6 (3.5 años)).

El caballo que tuvo los mejores resultados en sus valores de viabilidad de todos los caballos fue el caballo C4 (5años) de la UAT.

REACCIÓN ACROSOMAL

La reacción acrosomal fue aumentando con el descenso de la temperatura y el aumento del tiempo de refrigeración en los seis sementales.

En el grupo UPM el caballo que presentó los valores más altos de reacción acrosomal fue el C2 (19 años) y el que presentó los valores más bajos fue el C1 (9 años).

En el grupo UAT el caballo que tuvo los valores más altos de reacción acrosomal fue el C5 (18 años) y el que tuvo los valores más bajos fue el C6 (3 años y medio).

Los caballos jóvenes de la UAT presentaron valores más bajos de reacción acrosomal que los caballos jóvenes de la UPM. (C1 (9años), C3 (7 años), C4 (5años), C6 (3.5 años)).

El caballo que tuvo los mejores resultados en sus valores de reacción acrosomal fue el C4 de la UAT con 5 años de edad.

ANOMALÍAS ESPERMÁTICAS

En el grupo UPM los eyaculados de los caballos C3 (7 años) y el C2 (19 años) presentaron en promedio de las cuatro montas 25% de anormalidades primarias y secundarias, el caballo C1 (9 años) presentó en promedio de las cuatro montas 32% de anormalidades primarias y secundarias.

En el grupo UAT los eyaculados de los caballos C3 (3.5 años) y C4 (5 años) presentaron en promedio de las cuatro montas 13% de anomalías primarias y secundarias, el caballo C5 (18 años) presentó en promedio de las cuatro montas 28% de anomalías primarias y secundarias.

Los caballos jóvenes de la UAT presentaron menos anomalías espermáticas que los caballos jóvenes de la UPM.

DILUCIÓN

Las muestras de semen de los caballos C1 (9años), C3 (7años), C4 (5 años) tuvieron un mejor resultado en los parámetros de motilidad, viabilidad y reacción acrosomal al descenso de la temperatura durante el proceso de refrigeración en el Equitainer con la dilución D3(D3: 1:3). Las muestras de semen del caballo C2 (19 años) tuvieron mejores resultados con la dilución D1 (D1:1:1).

Las muestras de semen del C5 tuvieron buenos resultados con la dilución 3(D3: 1:3) para los parámetros de motilidad, viabilidad y reacción acrosomal, sin embargo la dilución 2 (D2: 1:2) también tuvo buenos resultados para la viabilidad.

Las muestras de semen del caballo C6 tuvieron buenos resultados con la dilución 3 (D3: 1:3) para los tres parámetros evaluados, sin embargo la dilución 2 (D2: 1:2) también tuvo buenos resultados para la motilidad y la reacción acrosomal.

La dilución que tuvo mejores resultados en las muestras en el grupo UPM/UAT en todos los parámetros fue la dilución 3(D3: 1:3).

PRUEBA DE LA DISPERSIÓN DE LA CROMATINA

La fragmentación del ADN fue acrecentándose de forma moderada conforme el descenso de la temperatura y el aumento del tiempo de refrigeración en los sementales C1, C2, C3, C4, C6 excepto en el semental C5 que presentó altos índices de fragmentación durante las cuatro montas; este semental de 18 años presentó también porcentajes bajos de motilidad, viabilidad y un alto porcentaje de reacción acrosomal.

El análisis de supervivencia con el método de Kaplan Meier mostró el alto índice de fragmentación del ADN espermático que presentaron los caballos viejos (C2: 19 años, C5: 18 años) de los grupos de la Policía Montada de la Cd. de México y de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas conforme pasó el tiempo en las cuatro montas y con respecto a los otros caballos de sus grupos. La misma prueba tomando en cuenta únicamente los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT mostró que los resultados del índice de fragmentación durante las cuatro montas fué homogéneo entre los caballos C1, C4, C6, teniendo el caballo C3 una diferencia notoria respecto a los otros caballos jóvenes. El caballo de 18 años fue el que mostró el mayor índice de fragmentación del ADN espermático del grupo UPM/UAT.

Hubo diferencia significativa entre los resultados del índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los seis caballos, conforme paso el tiempo del estudio en las cuatro montas.

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD Y VIABILIDAD CON LOS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN POR CABALLO

El caballo C1 con 9 años de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 6% con semen fresco, una motilidad de 95% y una viabilidad de 85%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 17%, con una motilidad de 65% y una viabilidad de 60%. (Promedios en las cuatro montas)

El caballo C2 con 19 años de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 12% con semen fresco, una motilidad de 66% y una viabilidad de 66%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 25%, con una motilidad de 3% y una viabilidad de 8%. (Promedios en las cuatro montas)

El caballo C3 con 7 años de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 15% con semen fresco, una motilidad de 76% y una viabilidad de 77%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 27%, con una motilidad de 41% y una viabilidad de 45%. (Promedios en las cuatro montas)

El caballo C4 con 5 años de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 6% con semen fresco, una motilidad de 94% y una viabilidad de 84%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 18%, con una motilidad de 61% y una viabilidad de 50%. (Promedios en las cuatro montas)

El caballo C5 con 18 años de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 94% con semen fresco, una motilidad de 36% y una viabilidad de 43%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 100%, con una motilidad de 10% y una viabilidad de 15%.

El caballo C6 con 3 años y medio de edad, con la dilución D3, presentó un índice de dispersión de la cromatina al inicio (T0) de 6% con semen fresco, una motilidad de 94% y una viabilidad de 84%. Y a las 36 horas de haber estado en refrigeración el índice de dispersión de la cromatina presentó 16%, con una motilidad de 55% y una viabilidad de 50%.

Los parámetros de motilidad y viabilidad tienen una correlación negativa con respecto al parámetro de fragmentación de ADN.

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

UPM.-Policía Montada de la Cd. de México

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado) **T.**-tiempo **M.**-Monta **C.**- caballo

C1. - Edad 9	}	UPM	C4. - Edad 5 años	}	UAT
C2. - Edad 19 años			C5. - Edad 18 años		
C3. - Edad 7 años			C6. - Edad 3 años y medio		

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

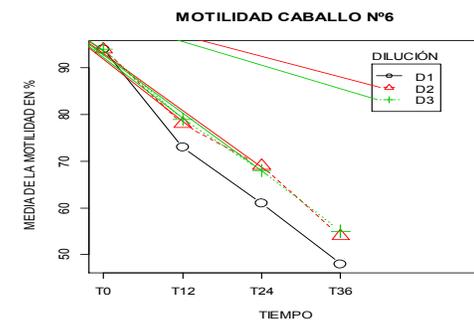
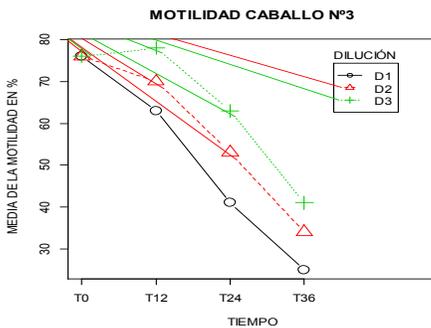
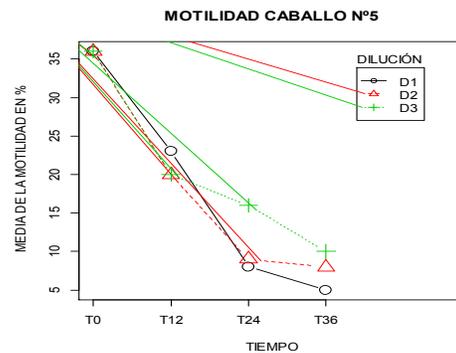
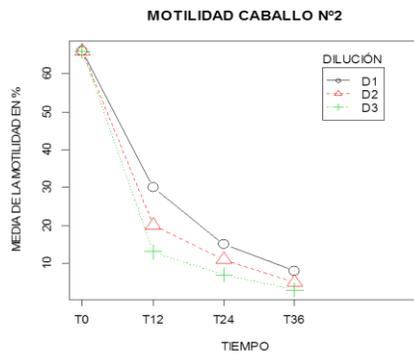
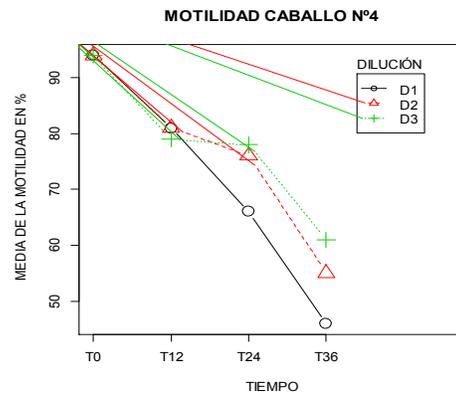
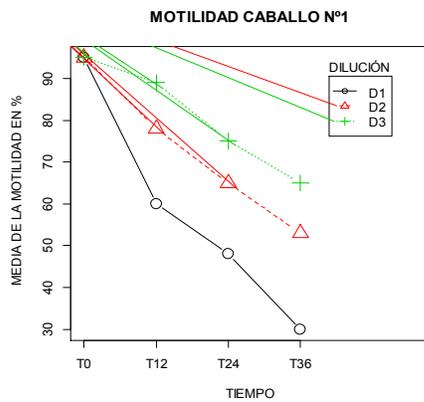
D1.- 1:1* **D2.**- 1:2* **D3.**- 1:3*

A) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE VARIANZA (ANOVA) CON EL PAQUETE R COMMANDER

(Promedio de las muestras de semen de las cuatro montas)

1.- MOTILIDAD

1.1.- MOTILIDAD POR CABALLO SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN



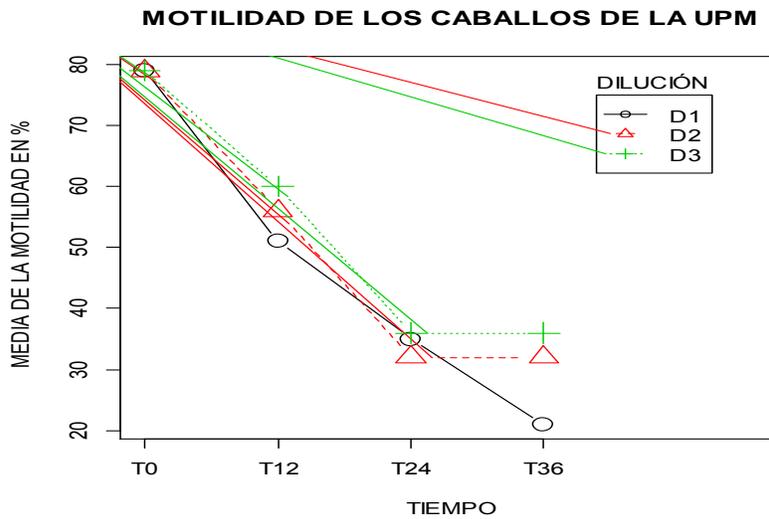
El caballo que tuvo los valores más altos de motilidad de los seis caballos fue el C4 y el que tuvo los valores más bajos de motilidad es el C5.

TIEMPO: T0.- Hora cero (INICIO) T12.- A las 12 horas* T24.- A las 24 horas* T36.- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado) D1.- 1:1* D2.- 1:2* D3.- 1:3*

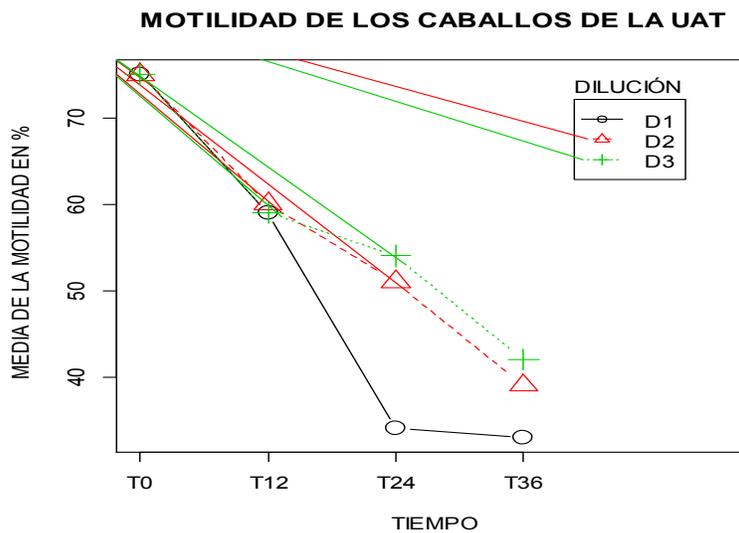
D.- dilución *DILUCIÓN.- parte de semen por partes de diluyente

1.2.- MOTILIDAD SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LA UAT.

UPM (Fig. a). UAT (Fig. b).



(Fig. a)



(Fig. b)

TIEMPO

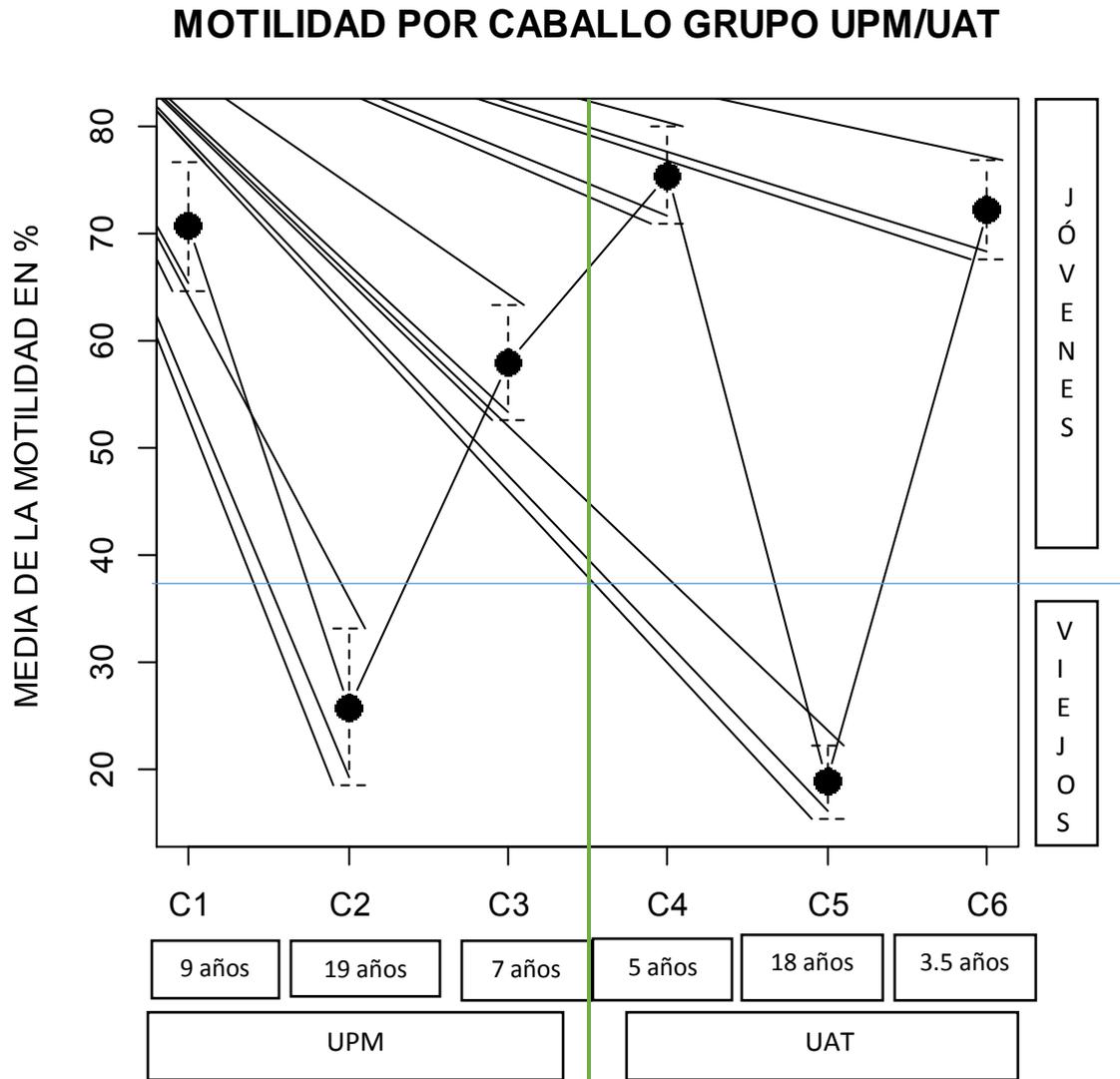
TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1* **D2.**- 1:2* **D3.**- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

1.3.- MOTILIDAD DEL GRUPO UPM/UAT

1.3.1.- MOTILIDAD POR CABALLO DEL GRUPO UPM/UAT

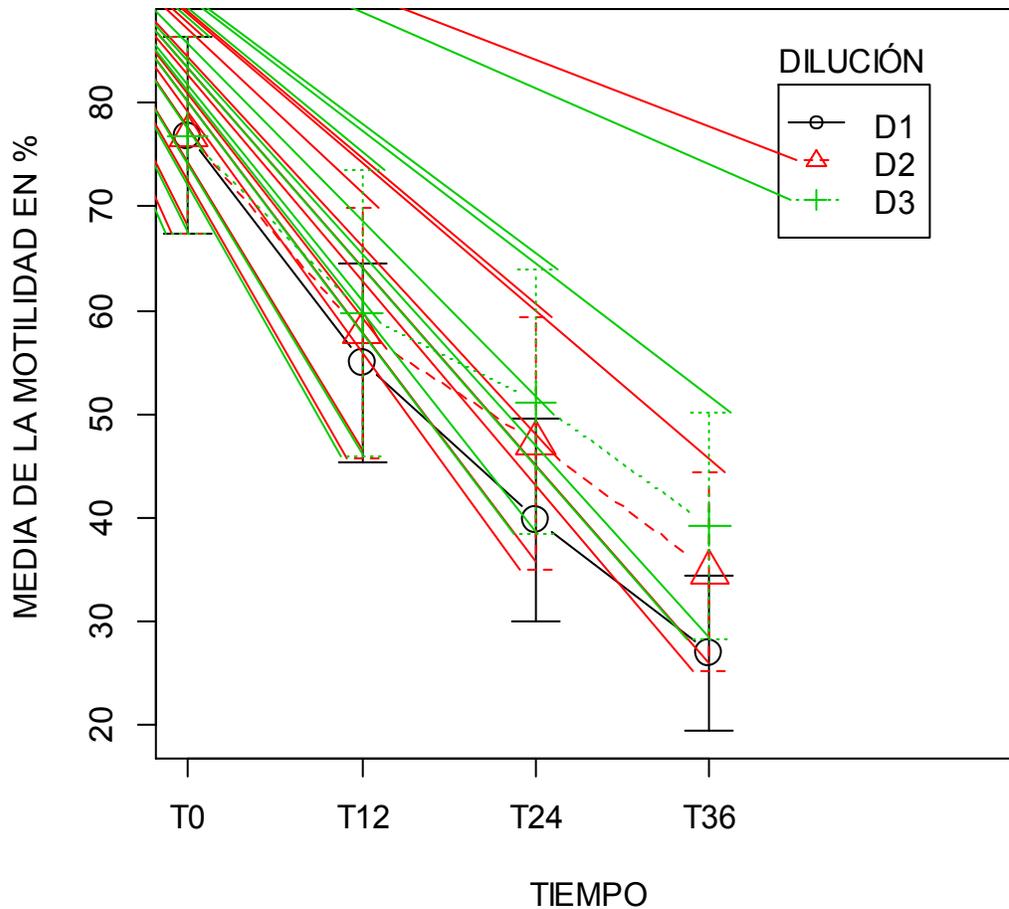


C1.- Edad 9 años **C2.-** Edad 19 años **C3.-** Edad 7 años **C4.-** Edad 5años
C5.- Edad 18 años **C6.-** Edad 3años y medio **C.-** Caballo

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México **UAT.-** Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

1.3.2.- MOTILIDAD SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD POR TIEMPO Y DILUCIÓN GRUPO UPM/UAT



En general la dilución 3(D31:3) tuvo los mejores resultados de motilidad.

TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

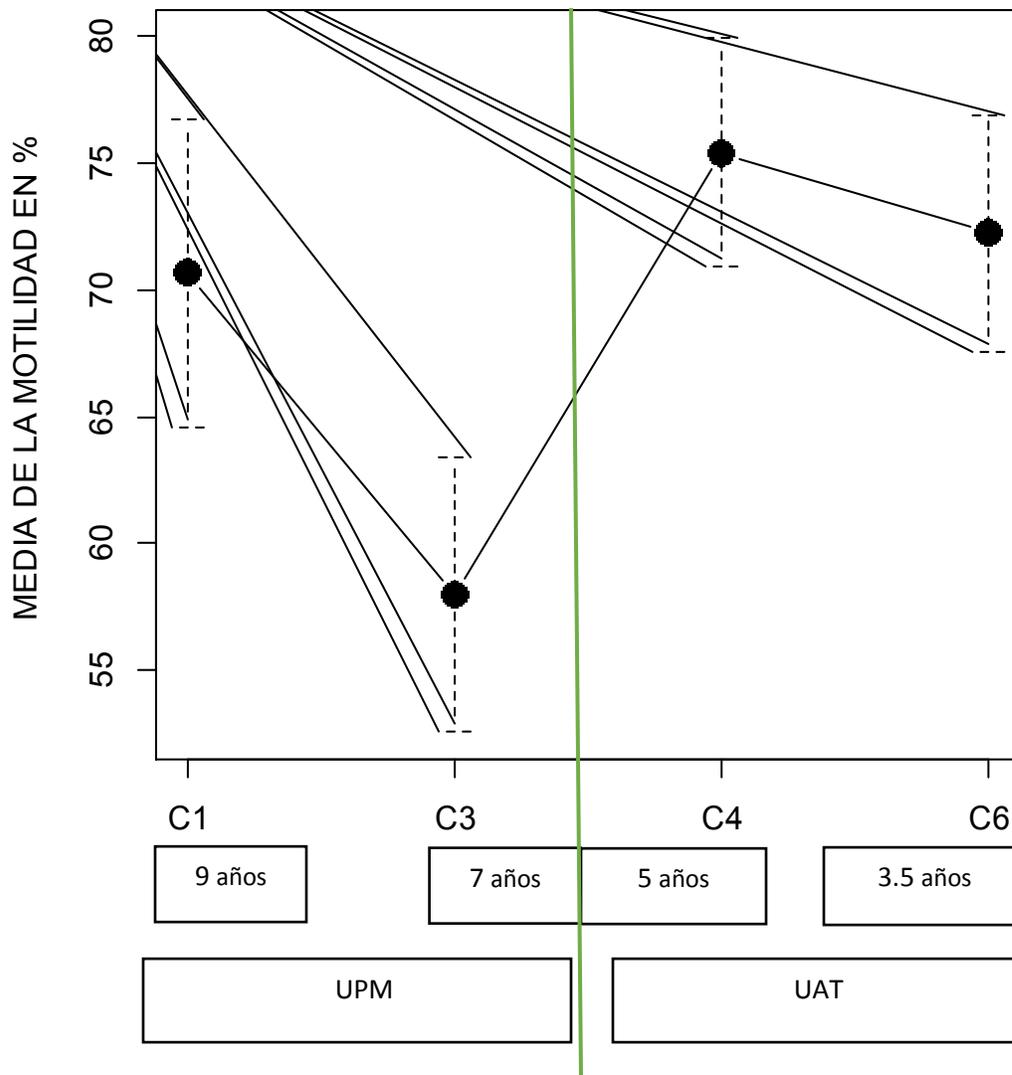
D3.- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

1.4.- MOTILIDAD DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

1.4.1.- MOTILIDAD POR CABALLO, DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD CABALLOS JÓVENES GRUPO UPM/UAT



En el grupo de los caballos jóvenes el que tuvo los valores más altos de motilidad es el C4 y el que tuvo los valores más bajos fue el C3.

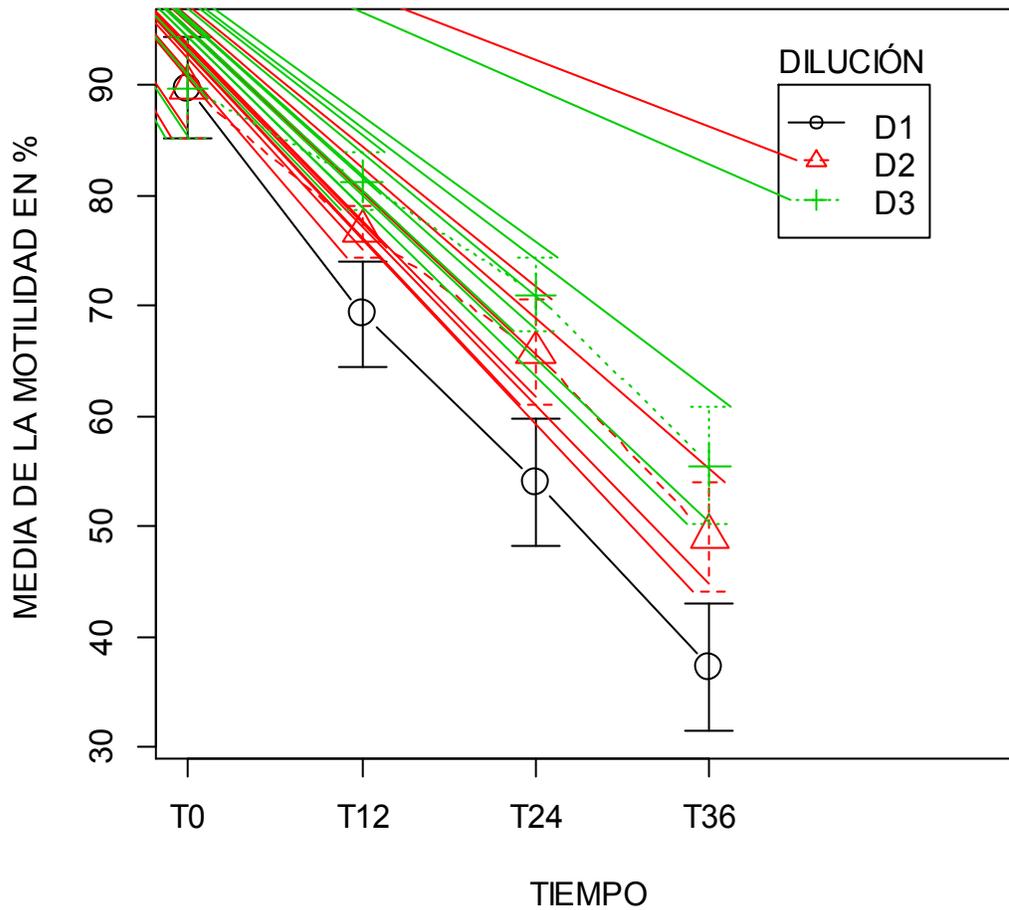
C1.- Edad 9 años **C3.-** Edad 7 años **UPM.-** Policía Montada de la Cd. de México

C4.- Edad 5 años **C6.-** Edad 3 años y medio **C.-** Caballo

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

1.4.2.- MOTILIDAD DE LOS CABALLOS JÓVENES POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD CABALLOS JÓVENES T/D GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

D3.- 1:3*

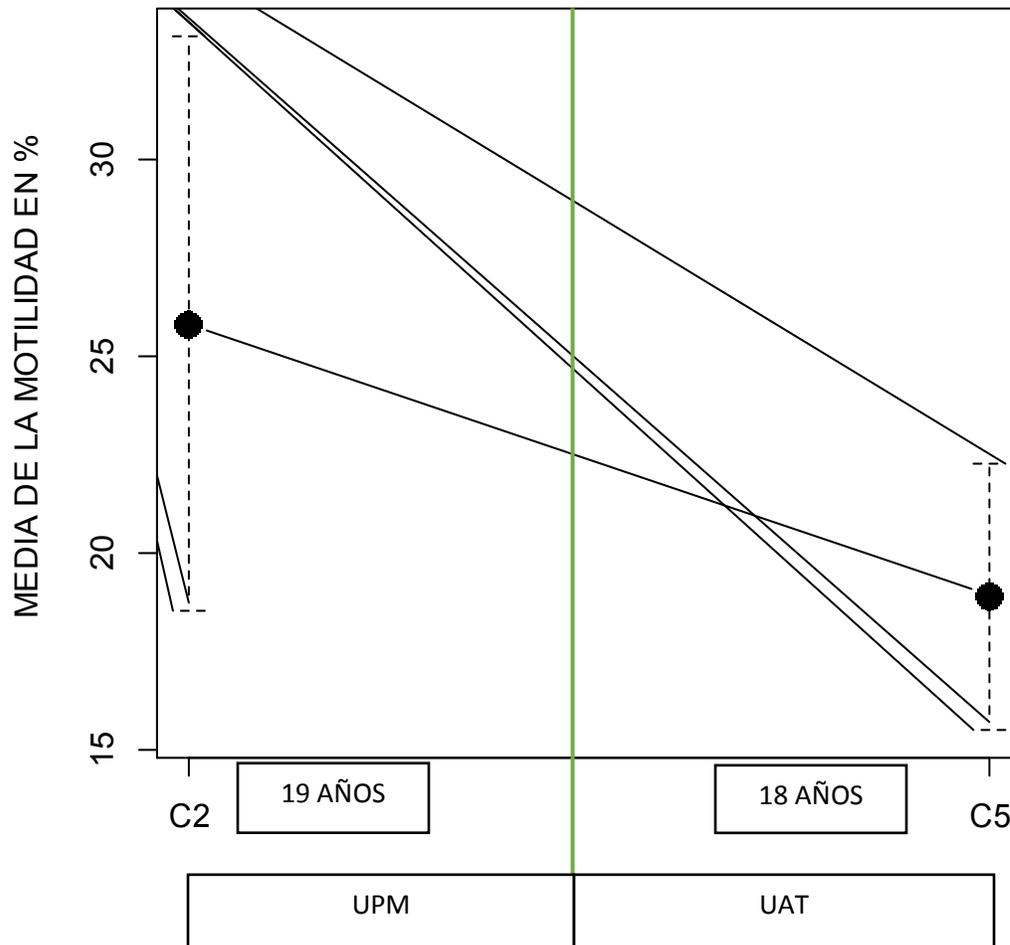
D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

T/D.- Tiempo/Dilución

1.5.- MOTILIDAD DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

1.5.1.- MOTILIDAD POR CABALLO DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD CABALLOS VIEJOS G. UPM/UAT



En el grupo de los caballos viejos el que tuvo los valores más altos de motilidad es el C2 y el que tuvo los valores más bajos fue el C5.

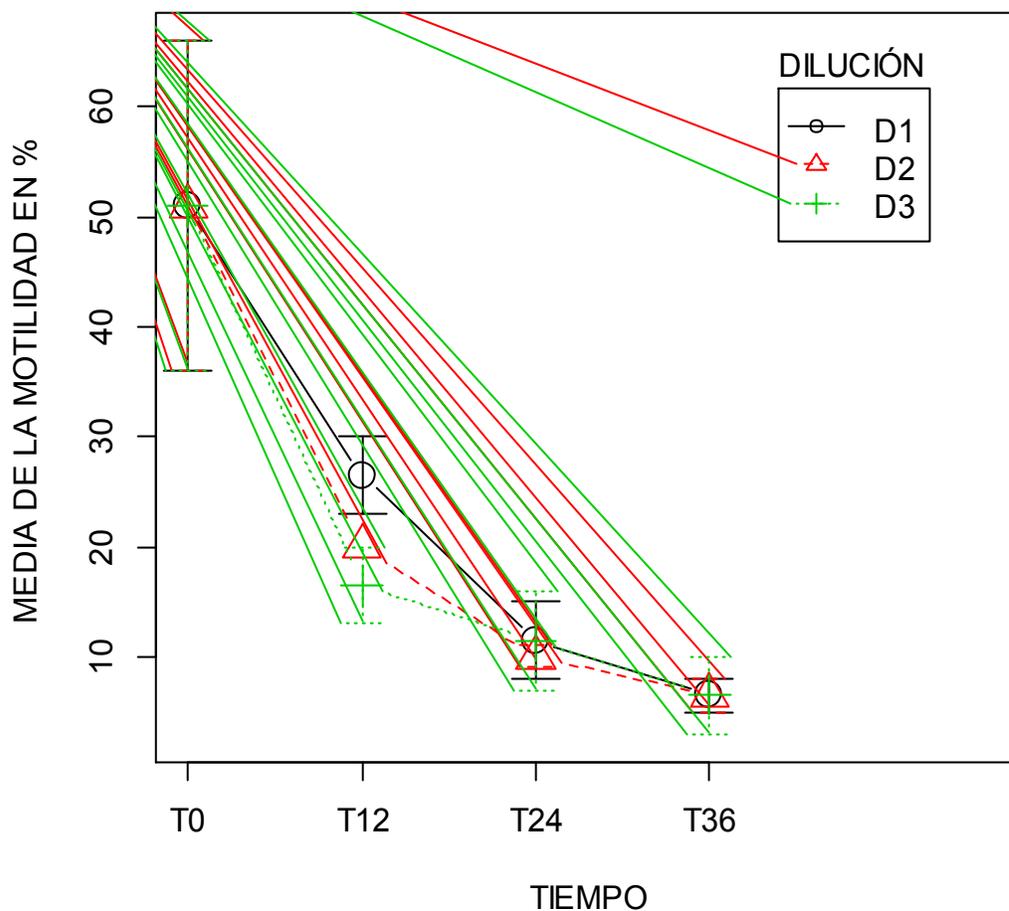
C2.- Edad 19 años **C5.-** Edad 18 años **C.-** Caballo **G.-** Grupo

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

1.5.2.- MOTILIDAD DE LOS CABALLOS VIEJOS POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD CABALLOS VIEJOS T/D GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12**.- A las 12 horas* **T24**.- A las 24 horas* **T36**.- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

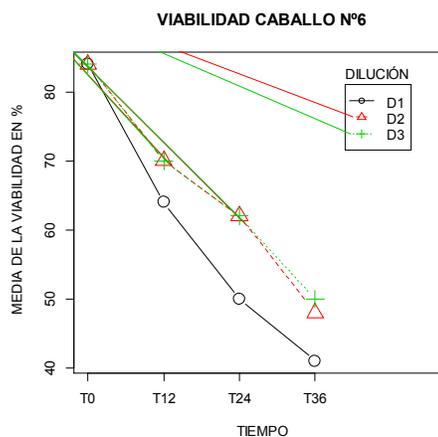
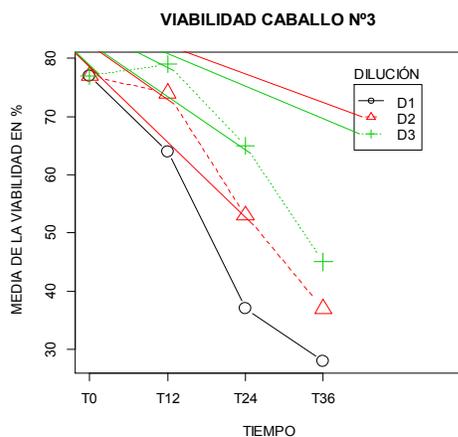
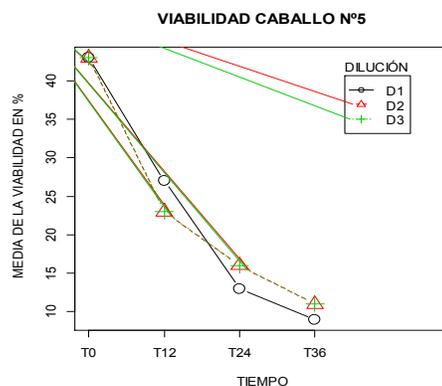
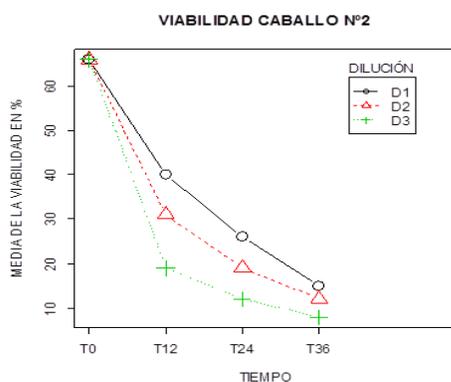
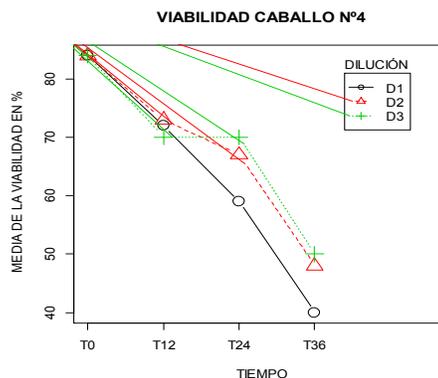
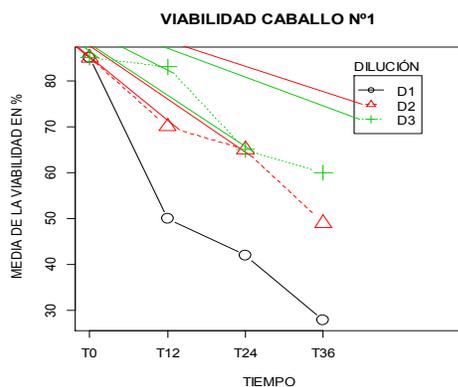
D3.- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN**.- parte de semen por partes de diluyente

T/D.- Tiempo/Dilución

2.- VIABILIDAD

2.1- VIABILIDAD POR CABALLO SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN

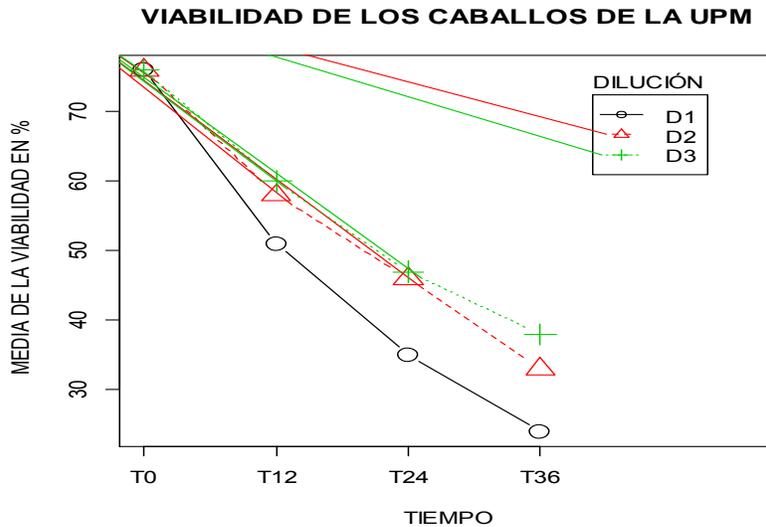


El caballo que tuvo los valores más altos de viabilidad de los seis caballos fue el C4 y el que tuvo los valores más bajos de viabilidad es el C5.

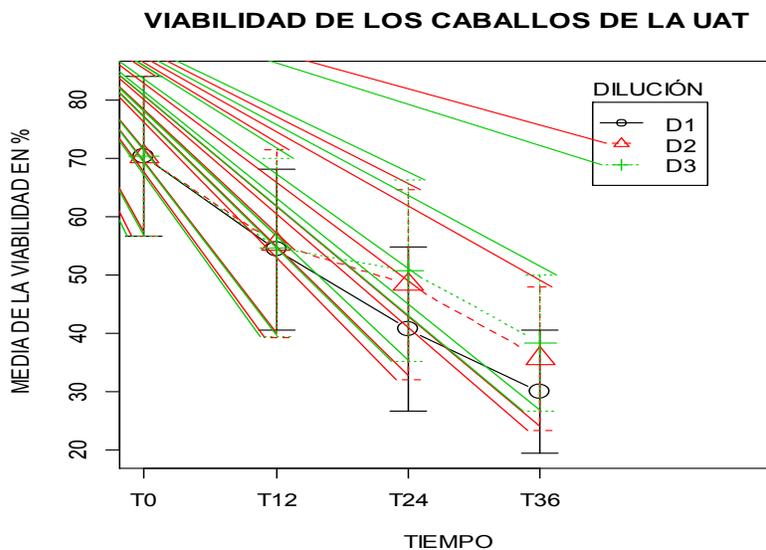
TIEMPO: T0.- Hora cero (INICIO) T12.- A las 12 horas* T24.- A las 24 horas* T36.- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado) **D1.-** 1:1* **D2.-** 1:2* **D3.-** 1:3*
D.- dilución ***DILUCIÓN.-** parte de semen por partes de diluyente

2.2.- VIABILIDAD SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LA UAT

UPM (Fig. a). UAT (Fig. b).



(Fig. a)



(Fig. b)

TIEMPO

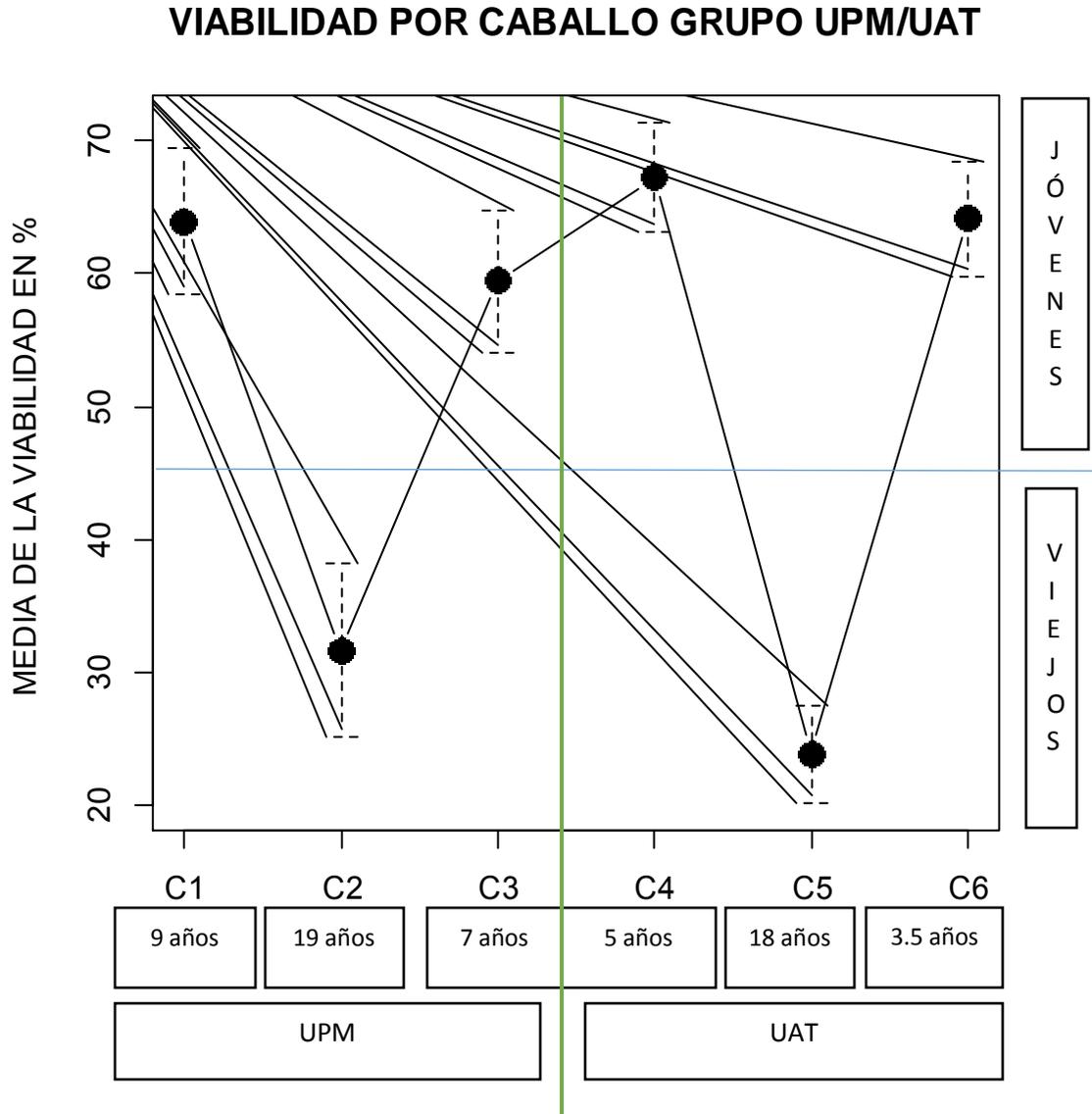
TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1* **D2.-** 1:2* **D3.-** 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.-** parte de semen por partes de diluyente

2.3.- VIABILIDAD DEL GRUPO UPM/UAT

2.3.1.- VIABILIDAD POR CABALLO DEL GRUPO UPM/UAT



C1.- Edad 9 años **C4.-** Edad 5años **C2.-** Edad 19 años **C5.-** Edad 18 años

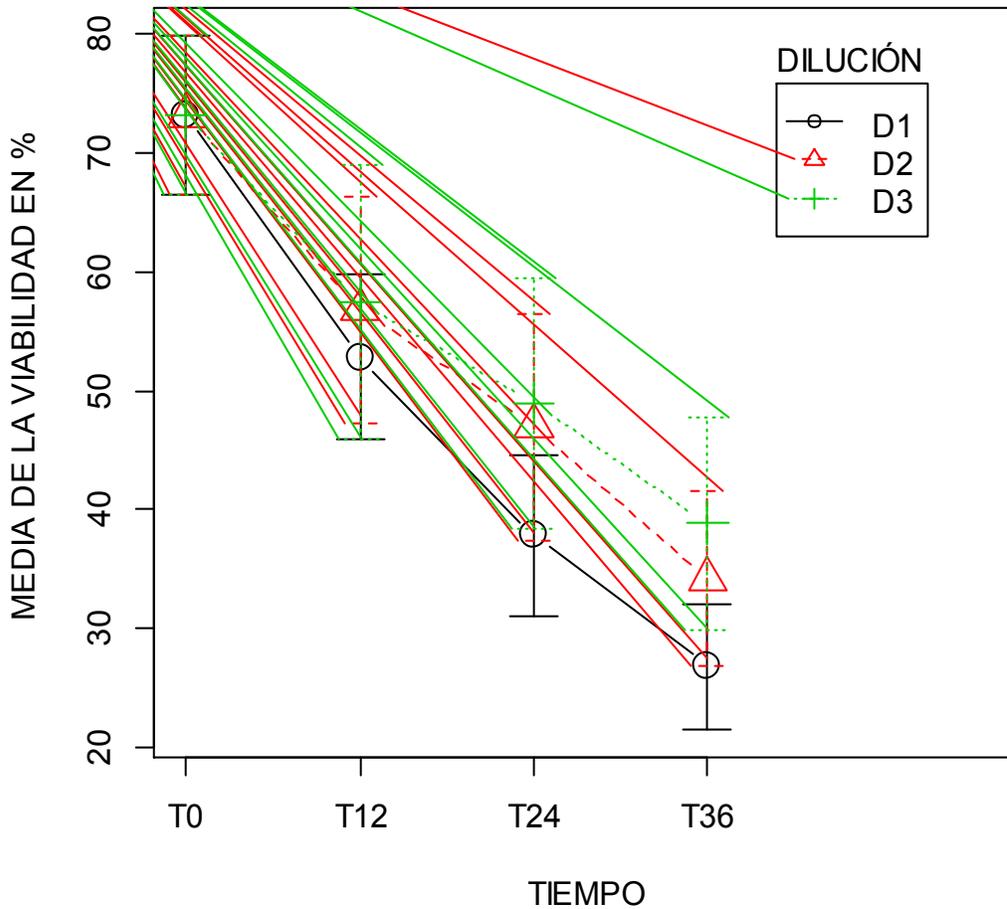
C3.- Edad 7 años **C6.-** Edad 3años y medio **C.-** Caballo

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

2.3.2.- VIABILIDAD SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD POR TIEMPO Y DILUCIÓN GRUPO UPM/UAT



En general la dilución 3(D31:3) tuvo los mejores resultados de viabilidad.

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

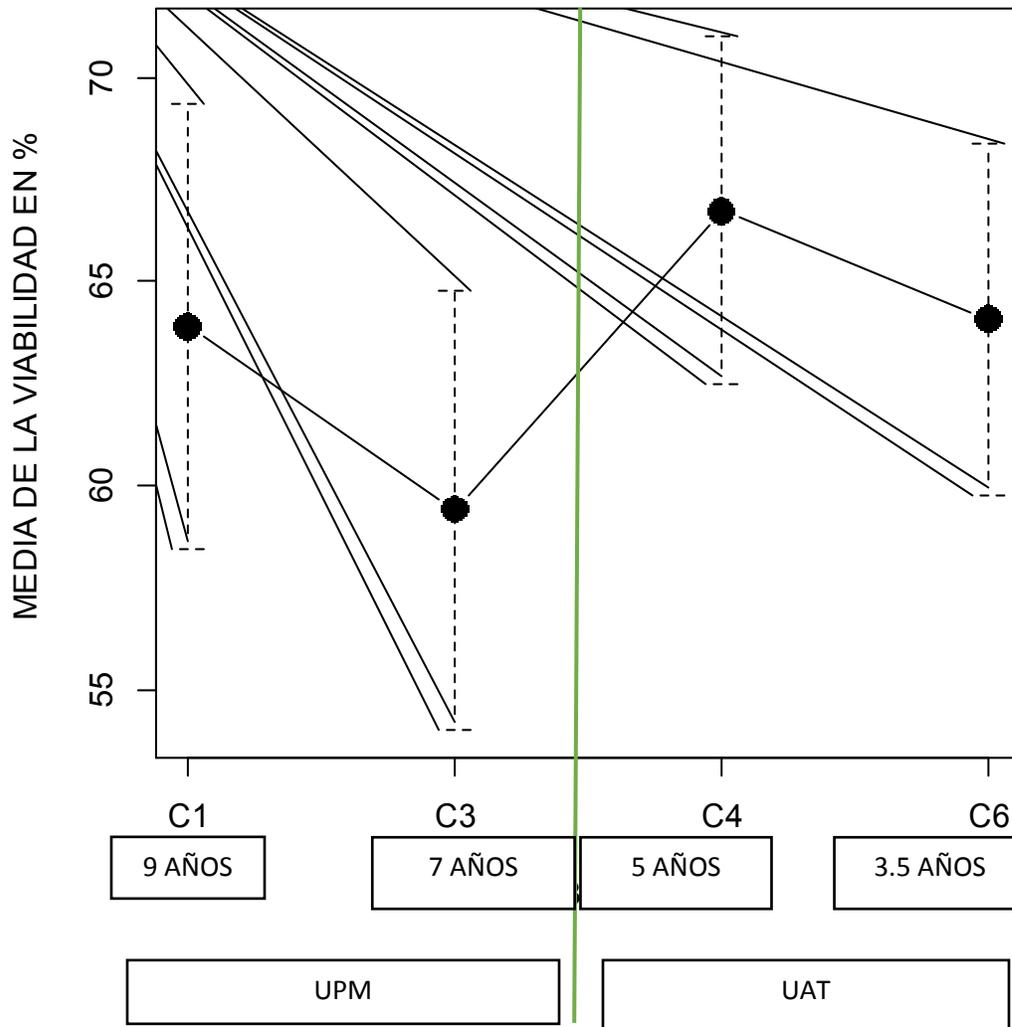
D3.- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

2.4.- VIABILIDAD DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

2.4.1.- VIABILIDAD POR CABALLO DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD CABALLOS JÓVENES GRUPO UPM/UAT



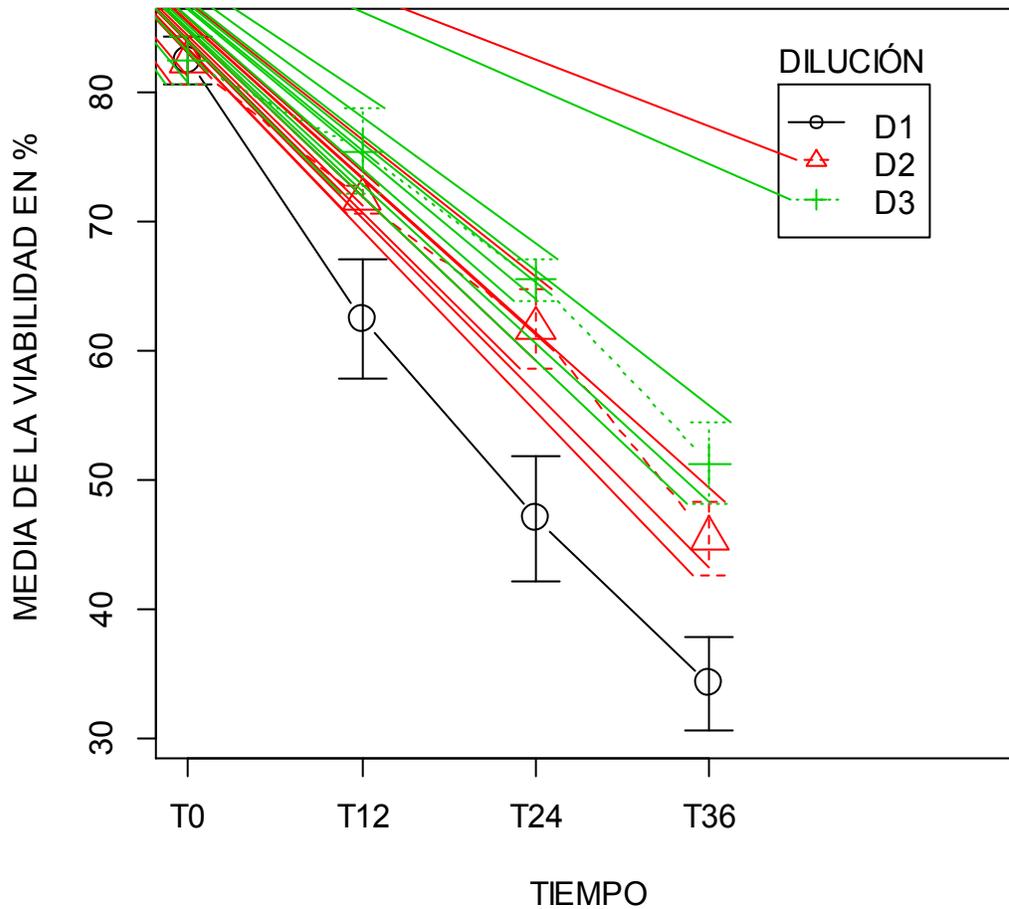
En el grupo de los caballos jóvenes el que tuvo los valores más altos de viabilidad es el C4 y el que tuvo los valores más bajos fue el C3.

C1.- Edad 9 años C3.- Edad 7 años C4.- Edad 5 años C6.- Edad 3 años y medio
C.- Caballo UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

2.4.2.- VIABILIDAD CABALLOS JÓVENES POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD CABALLOS JÓVENES T/D GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12**.- A las 12 horas* **T24**.- A las 24 horas* **T36**.- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

D3.- 1:3*

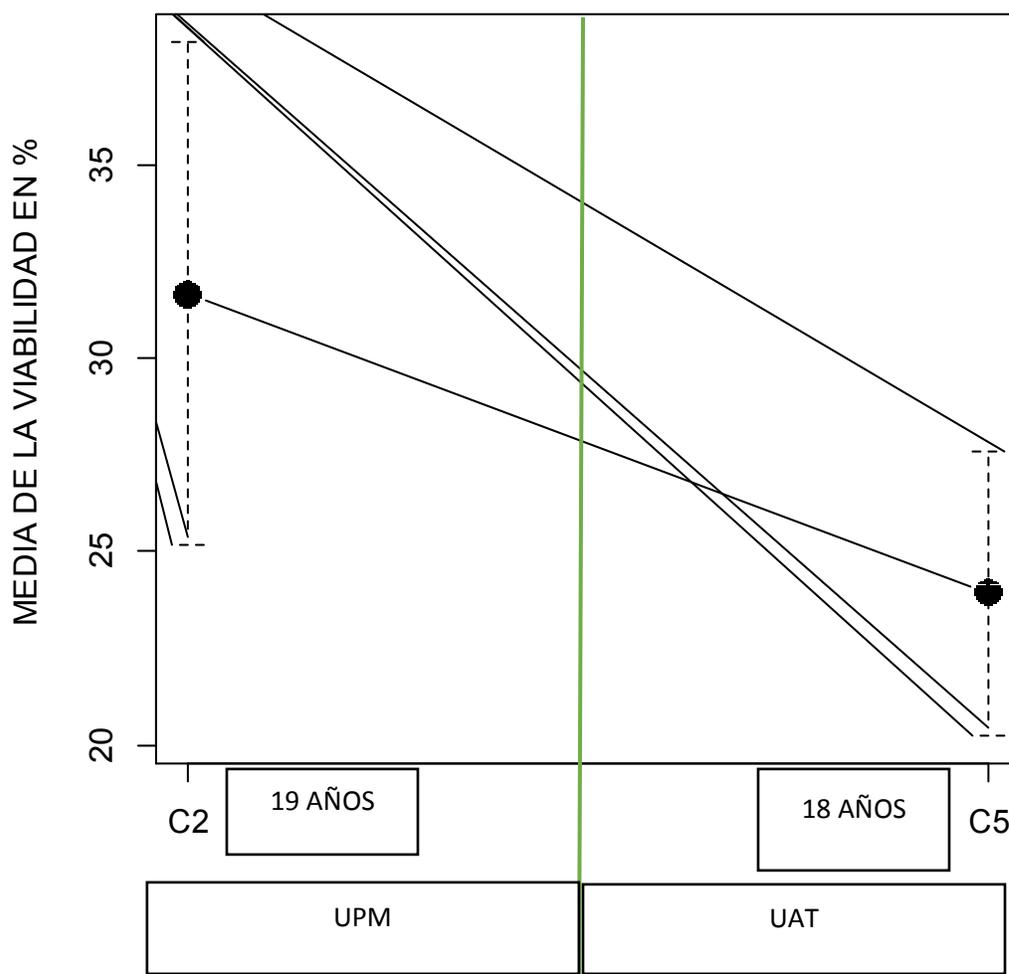
D.- dilución ***DILUCIÓN**.- parte de semen por partes de diluyente

T/D.- Tiempo/Dilución

2.5.- VIABILIDAD DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

2.5.1.- VIABILIDAD POR CABALLO DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD CABALLOS VIEJOS G. UPM/UAT



En el grupo de los caballos viejos el que tuvo los valores más altos de viabilidad es el C2 y el que tuvo los valores más bajos fue el C5.

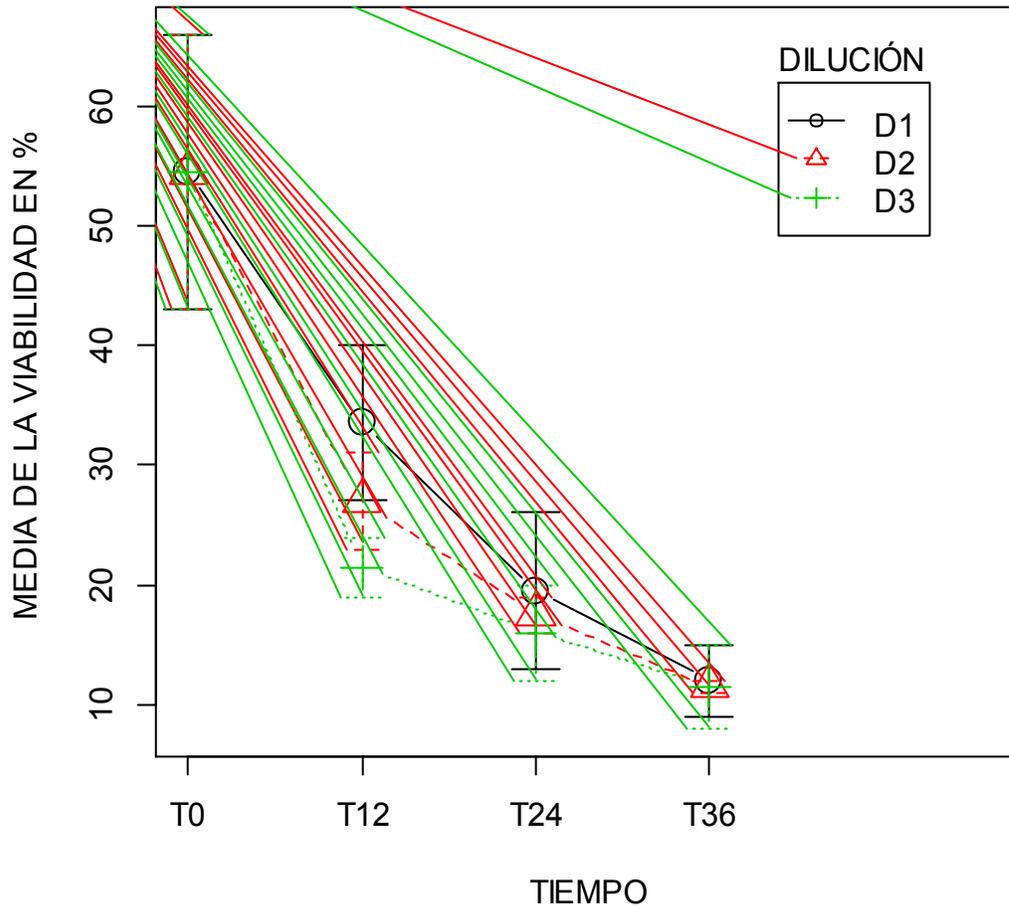
C2.- Edad 19 años C5.- Edad 18 años C.- Caballo G.- Grupo

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

2.5.2.- VIABILIDAD CABALLOS VIEJOS POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD CABALLOS VIEJOS T/D GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

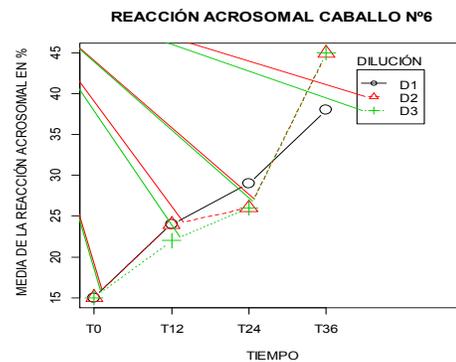
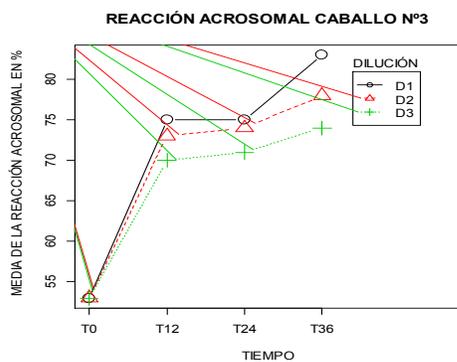
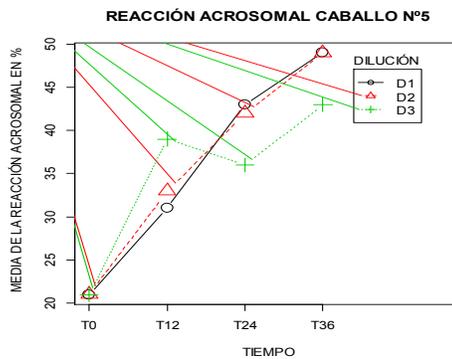
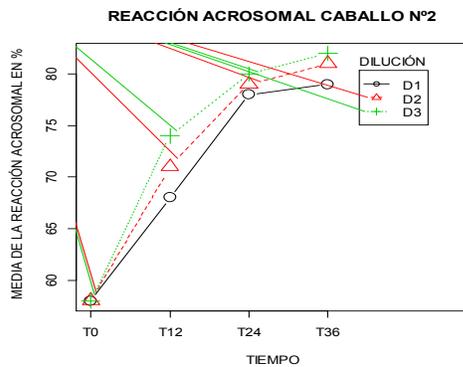
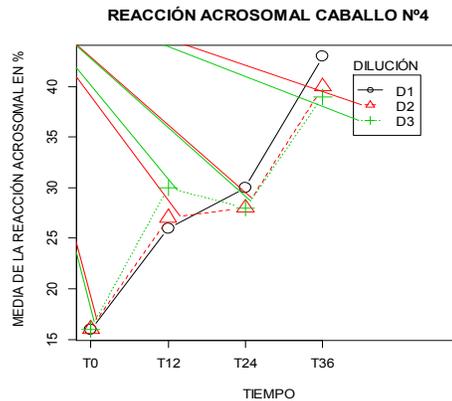
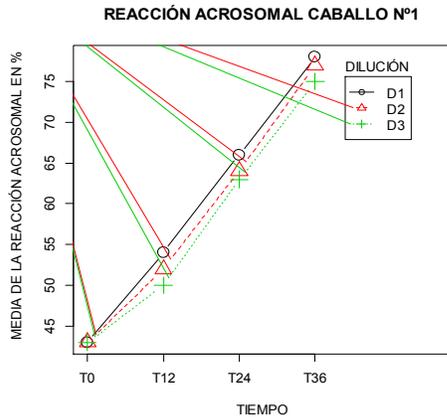
D3.- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

T/D.- Tiempo/Dilución **C.**- Caballos

3.- REACCIÓN ACROSOMAL

3.1.- REACCIÓN ACROSOMAL POR CABALLO SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN



El caballo que tuvo los valores más bajos de reacción acrosomal de los seis caballos fue el C6 y el que tuvo los valores más altos de reacción acrosomal es el C2.

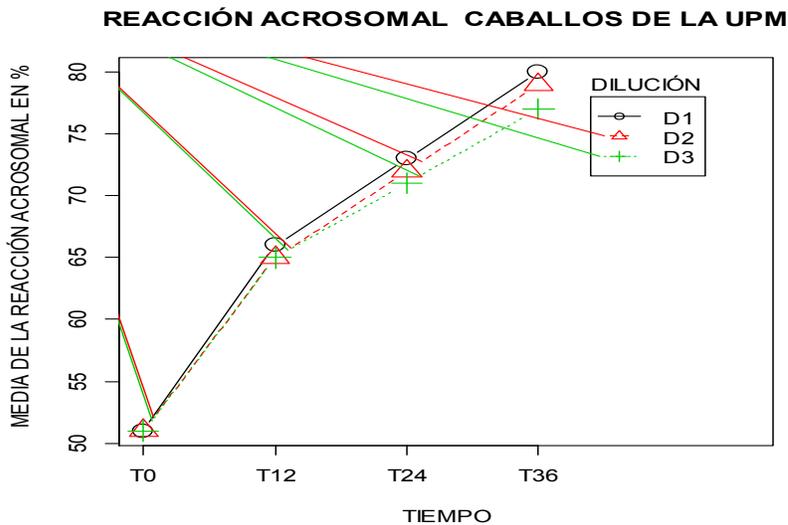
TIEMPO: T0.- Hora cero (INICIO) T12.- A las 12 horas* T24.- A las 24 horas* T36.- A las 36 horas* (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1* **D2.-** 1:2* **D3.-** 1:3*

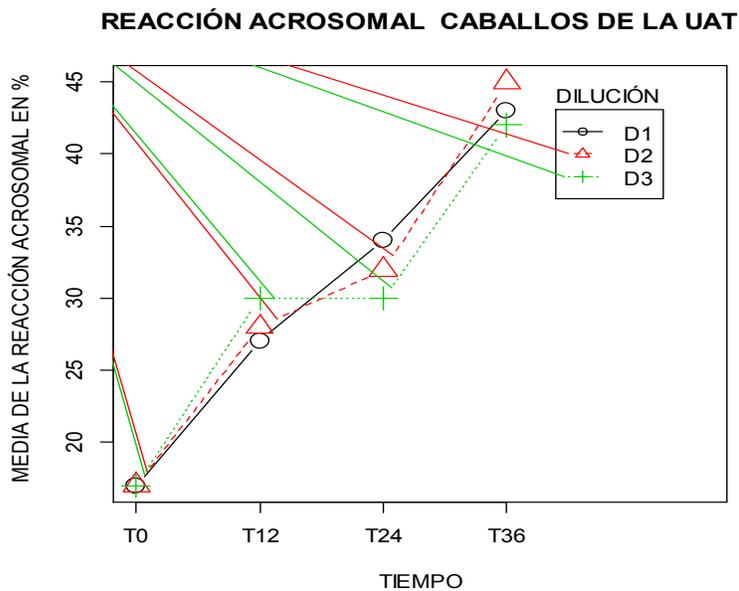
D.- dilución ***DILUCIÓN.-** parte de semen por partes de diluyente

3.2.- REACCIÓN ACROSOMAL SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DE LOS CABALLOS DE LA UPM (Fig. a) Y DE LA UAT (Fig. b).

UPM (Fig. a). UAT (Fig. b).



(Fig. a)



(Fig. b)

TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

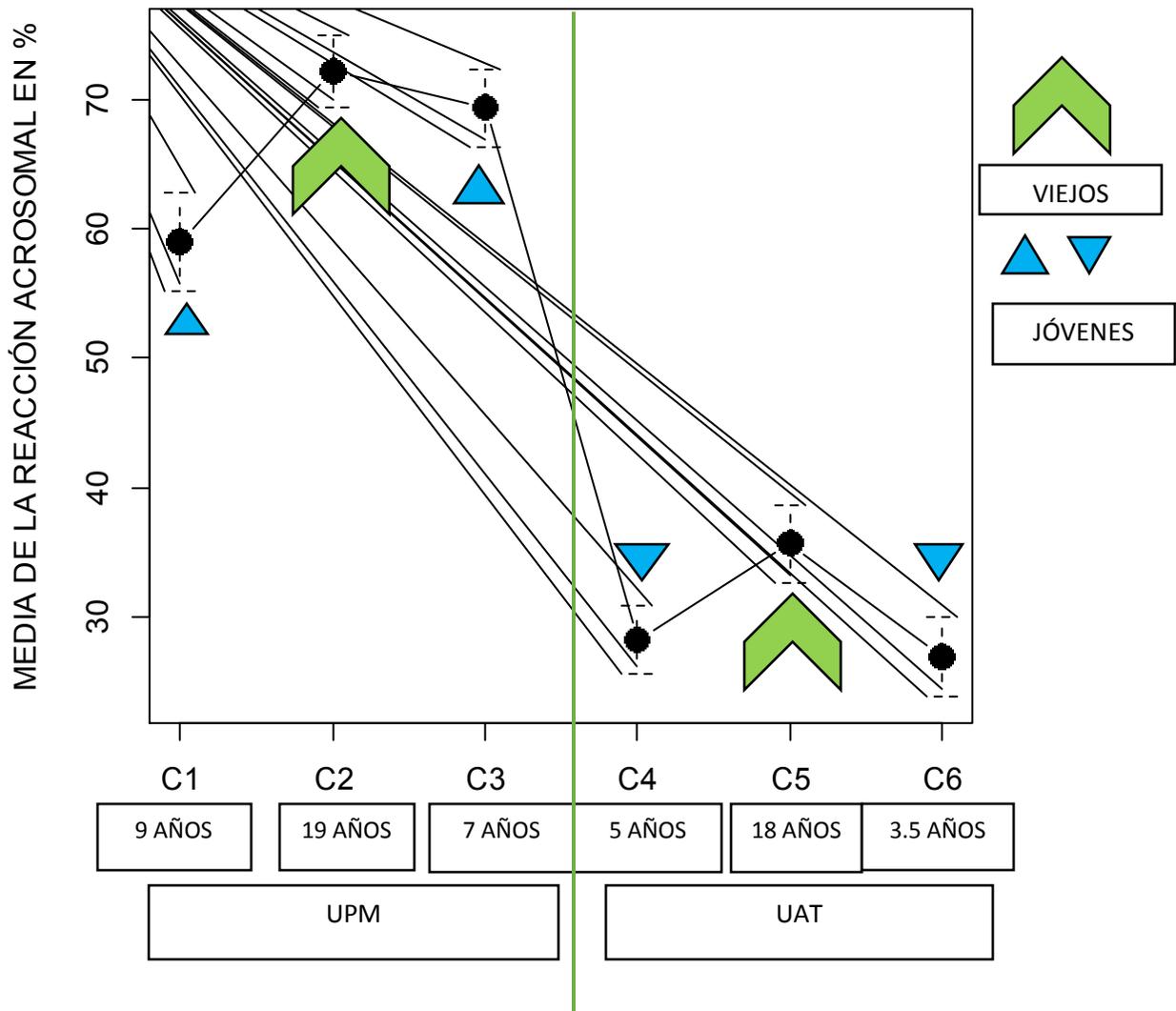
D1.- 1:1* **D2.**- 1:2* **D3.**- 1:3*

D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

3.3.- REACCIÓN ACROSOMAL DEL GRUPO UPM/UAT

3.3.1.- REACCIÓN ACROSOMAL POR CABALLO DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL POR CABALLO G. UPM/UAT



C1.- Edad 9 años

C2.- Edad 19 años

C3.- Edad 7 años

C4.- Edad 5 años

C5.- Edad 18 años

C6.- Edad 3 años y medio

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

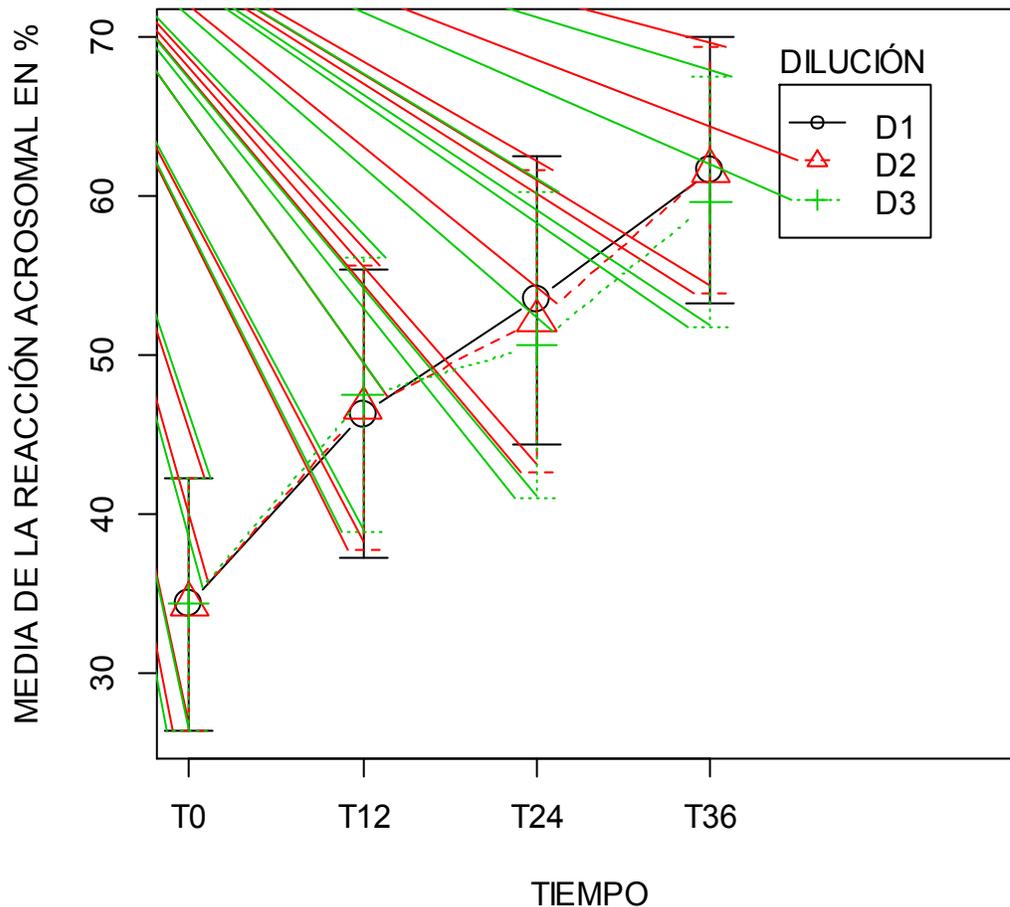
G.- Grupo

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

Los caballos C2 y C5 presentan los valores más altos de reacción acrosomal con respecto a su grupo. Los caballos de la UPM presentan más reacción acrosomal que los caballos de la UAT.

3.3.2- REACCIÓN ACROSOMAL SEGÚN EL TIEMPO Y LA DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL T/D GRUPO UPM/UAT



La dilución 2(D2:1:2) tuvo más reacción acrosomal y la que menos tuvo fue la dilución 3(D3:1:3).

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

D3.- 1:3*

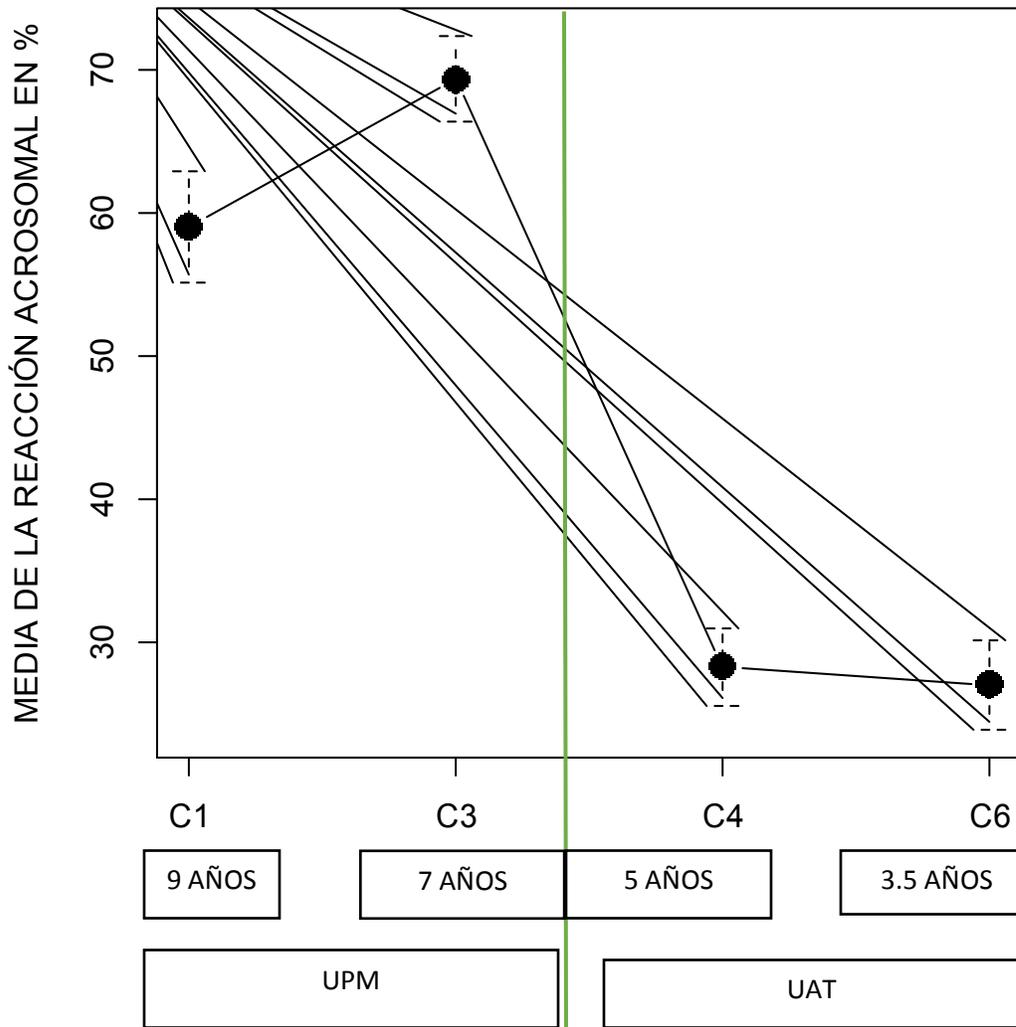
D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

C.- Caballos **T/D.**- Tiempo/ Dilución

3.4.- REACCIÓN ACROSOMAL DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

3.4.1.- REACCIÓN ACROSOMAL POR CABALLO DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL C. JÓVENES GRUPO UPM/UAT



En el grupo de los caballos jóvenes el que tuvo menos reacción acrosomal fue el C6 y el que tuvo más fue el C3.

C1.- Edad 9 años C4.- Edad 5 años C.- Caballo

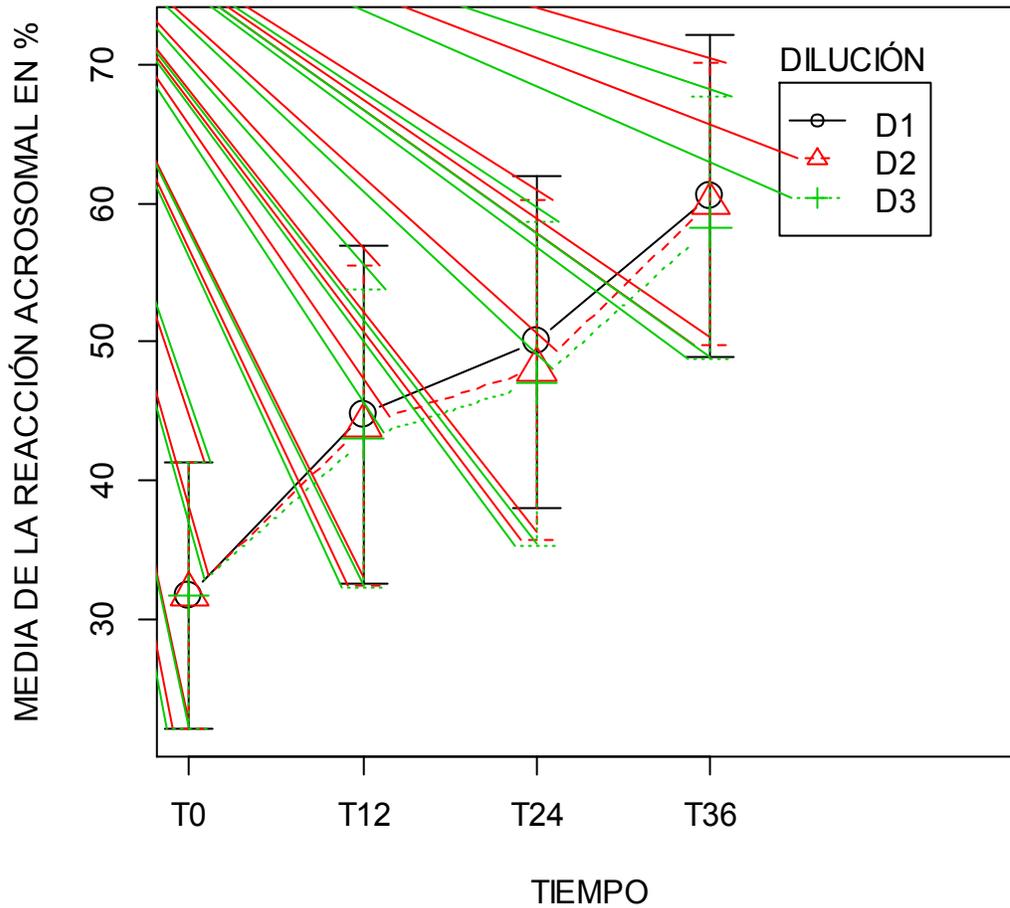
C3.- Edad 7 años C6.- Edad 3 años y medio

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

3.4.2.- REACCIÓN ACROSOMAL DE LOS CABALLOS JÓVENES POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL C. JÓVENES T/D G. UPM/UAT



TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

D3.- 1:3*

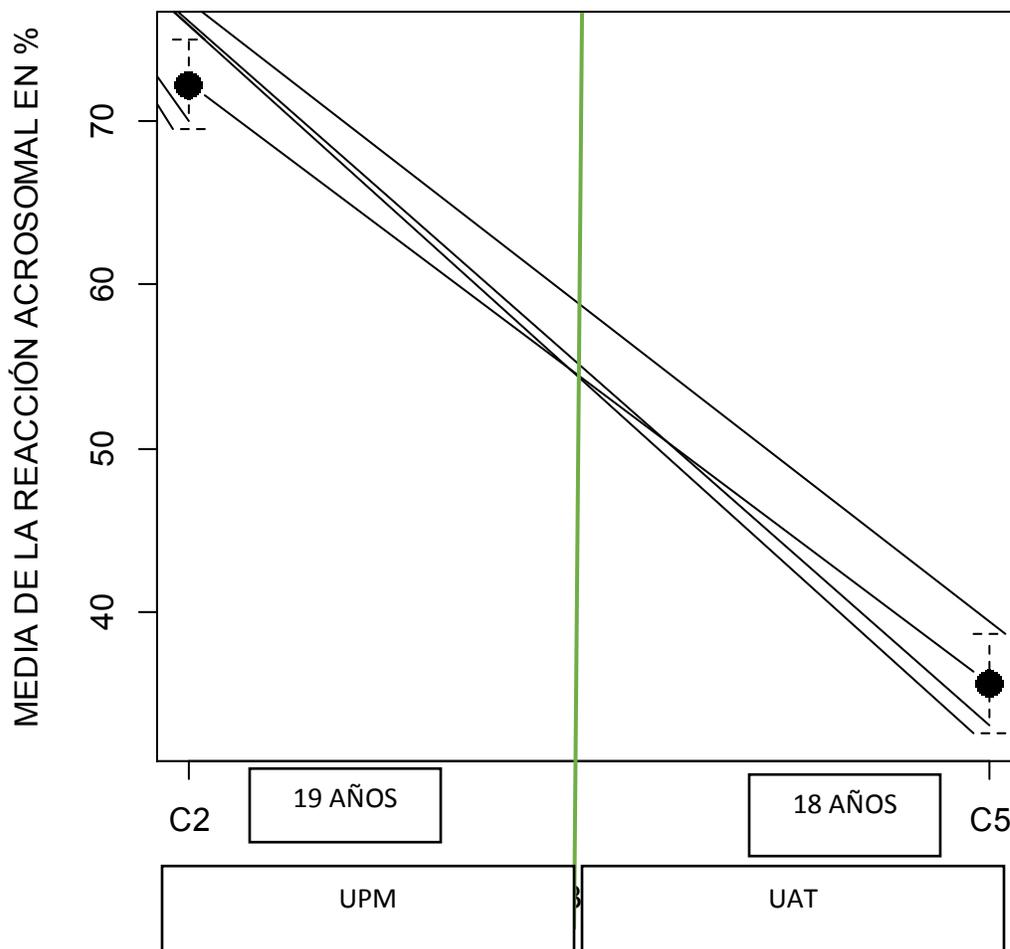
D.- dilución ***DILUCIÓN.**- parte de semen por partes de diluyente

C.- Caballos **T/D.**- Tiempo/Dilución **G.**- Grupo

3.5.- REACCIÓN ACROSOMAL DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

3.5.1.- REACCIÓN ACROSOMAL POR CABALLO DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL C. VIEJOS G. UPM/UAT



En el grupo de los caballos viejos el que tuvo menos reacción acrosomal fue el C5 y el que tuvo más fue el C2.

C2.- Edad 19 años

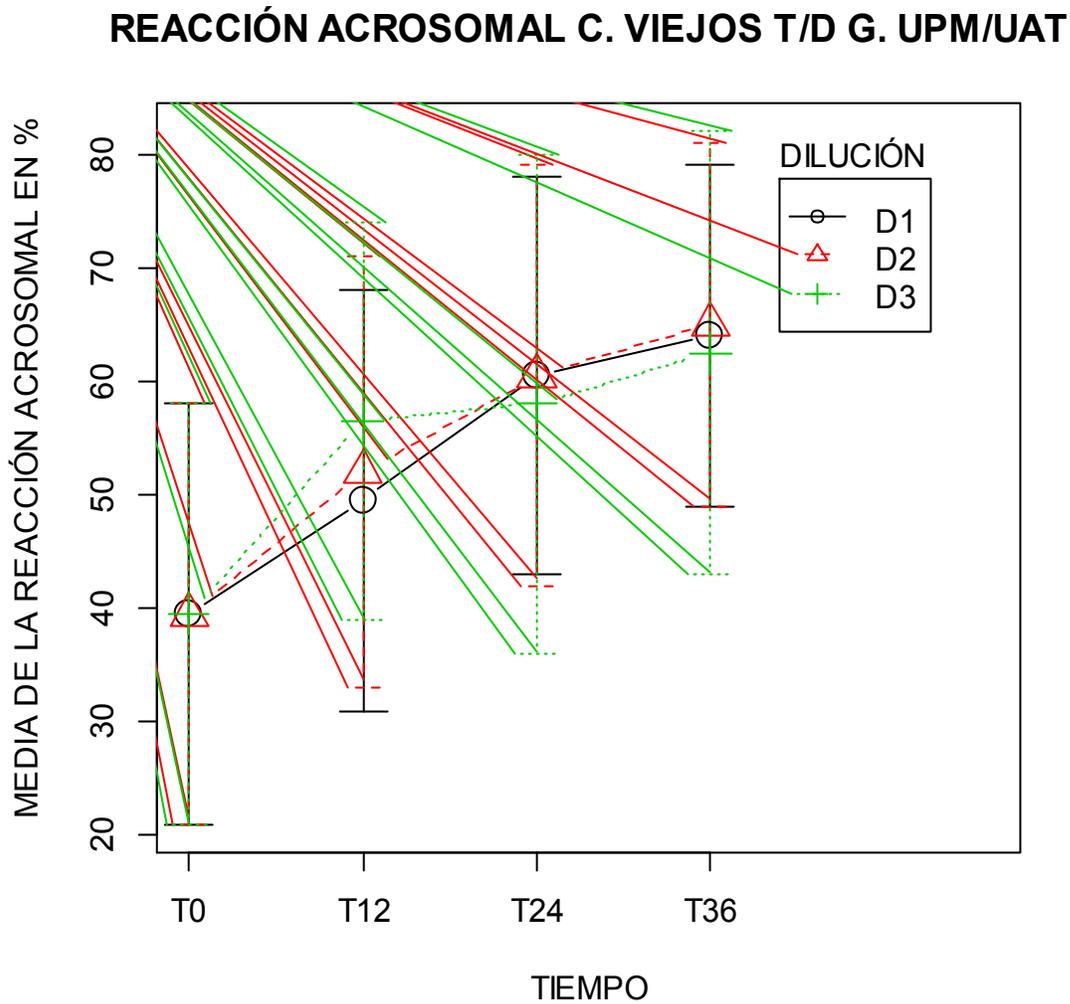
C5.- Edad 18 años

C.- Caballos G.- Grupo

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

3.5.2.- REACCIÓN ACROSOMAL DE LOS CABALLOS VIEJOS POR TIEMPO Y DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

D1.- 1:1*

D2.- 1:2*

D3.- 1:3*

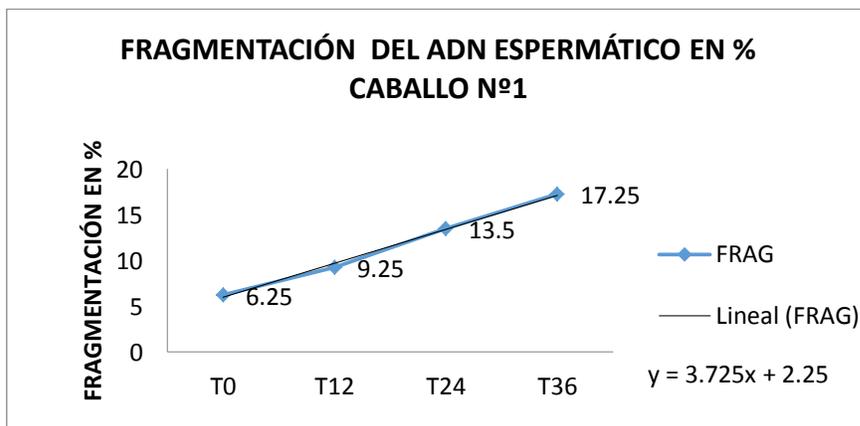
D.- dilución ***DILUCIÓN.-** parte de semen por partes de diluyente

C.- Caballos **T/D.-** Tiempo/Dilución

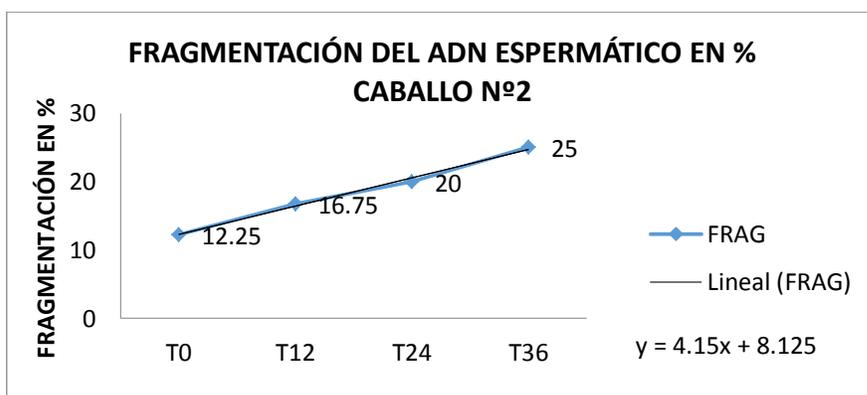
4.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

4.1- FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PORCENTAJE POR CABALLO

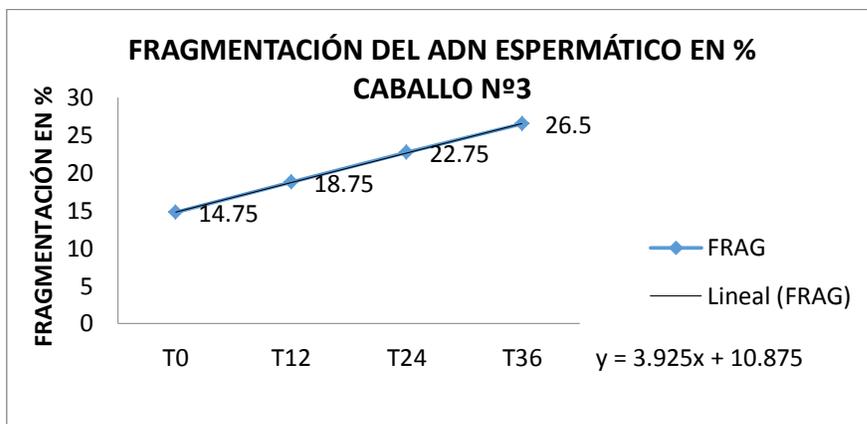
(Fig. a, b, c, d, e, f)



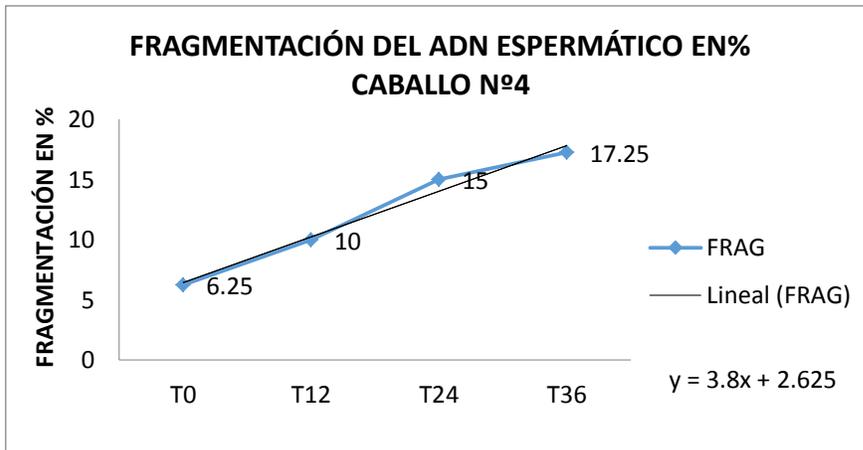
(Fig. a)



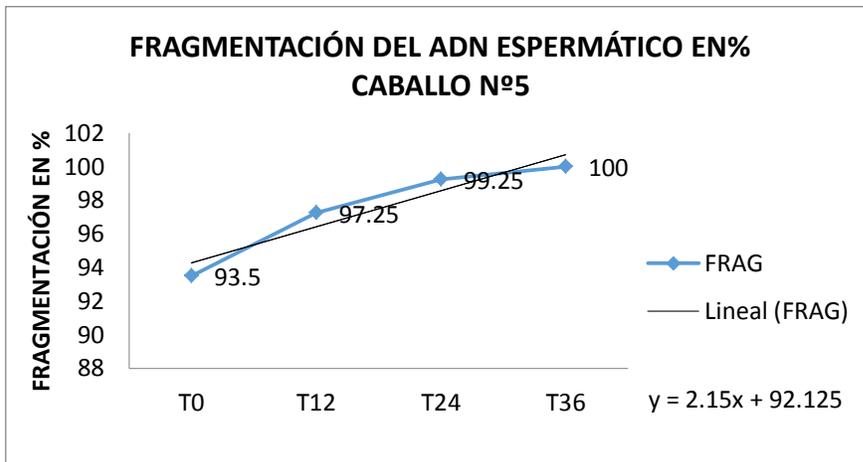
(Fig. b)



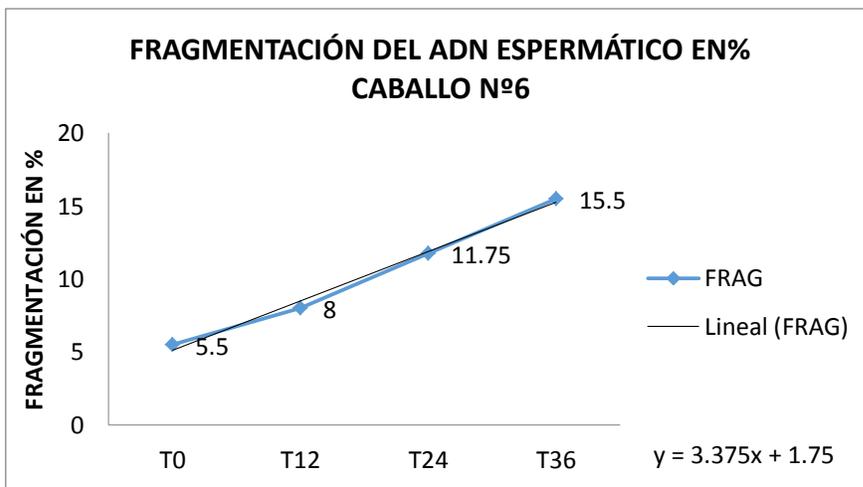
(Fig.c)



(Fig.d)



(Fig.e)



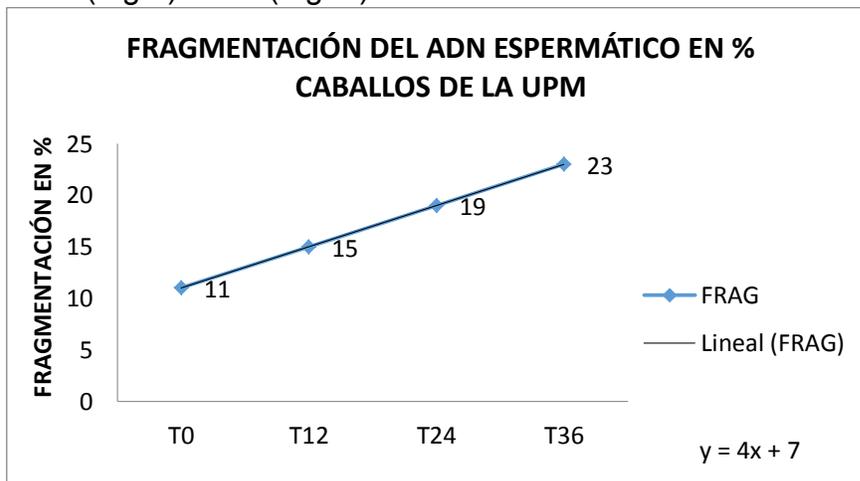
(Fig.f)

El índice de dispersión de la cromatina es muy similar en los caballos C1 y C4, el C2 y el C3; el índice de dispersión de la cromatina del C5 es el más alto y el C6 es el más bajo durante el tiempo del estudio.

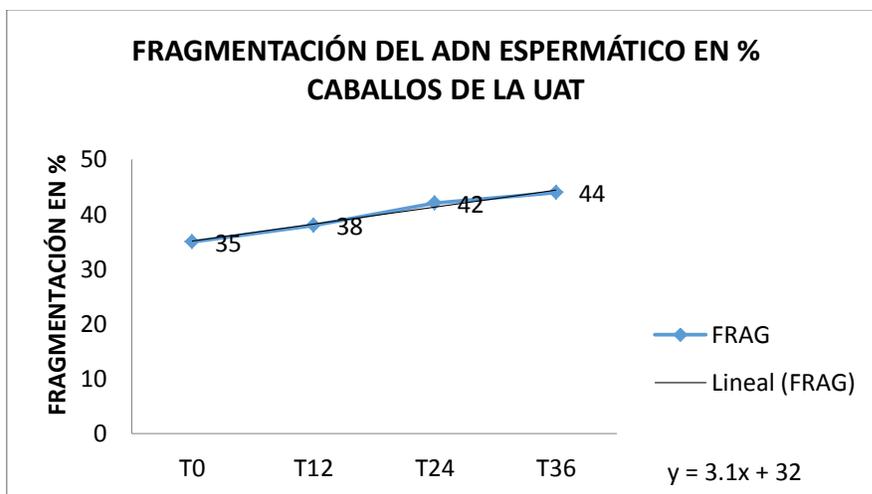
Frag.- Fragmentación del ADN **Lineal.-** línea de tendencia **T.-** tiempo

4.2.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PORCENTAJE DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LA UAT

UPM (Fig.a). UAT (Fig. b).



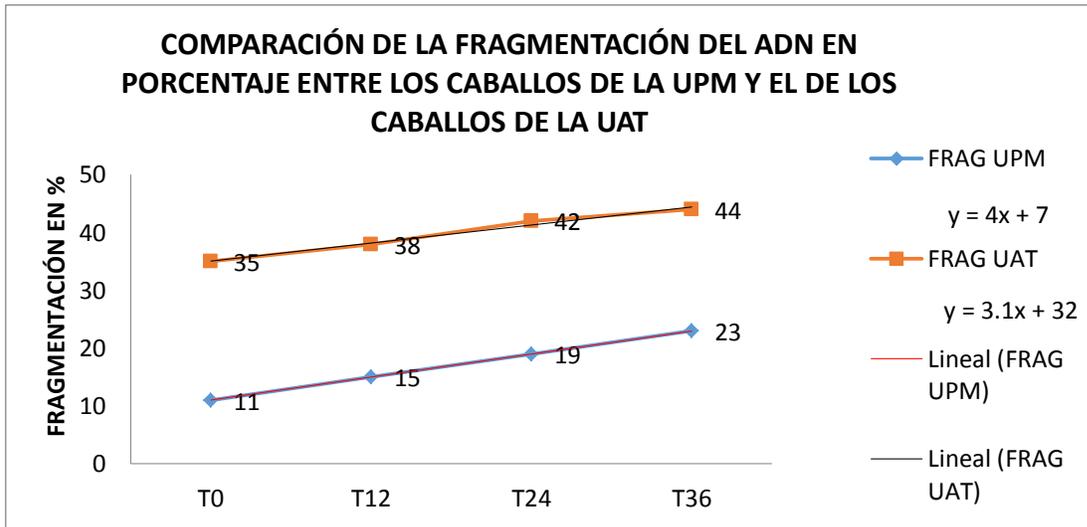
(Fig.a)



(Fig. b)

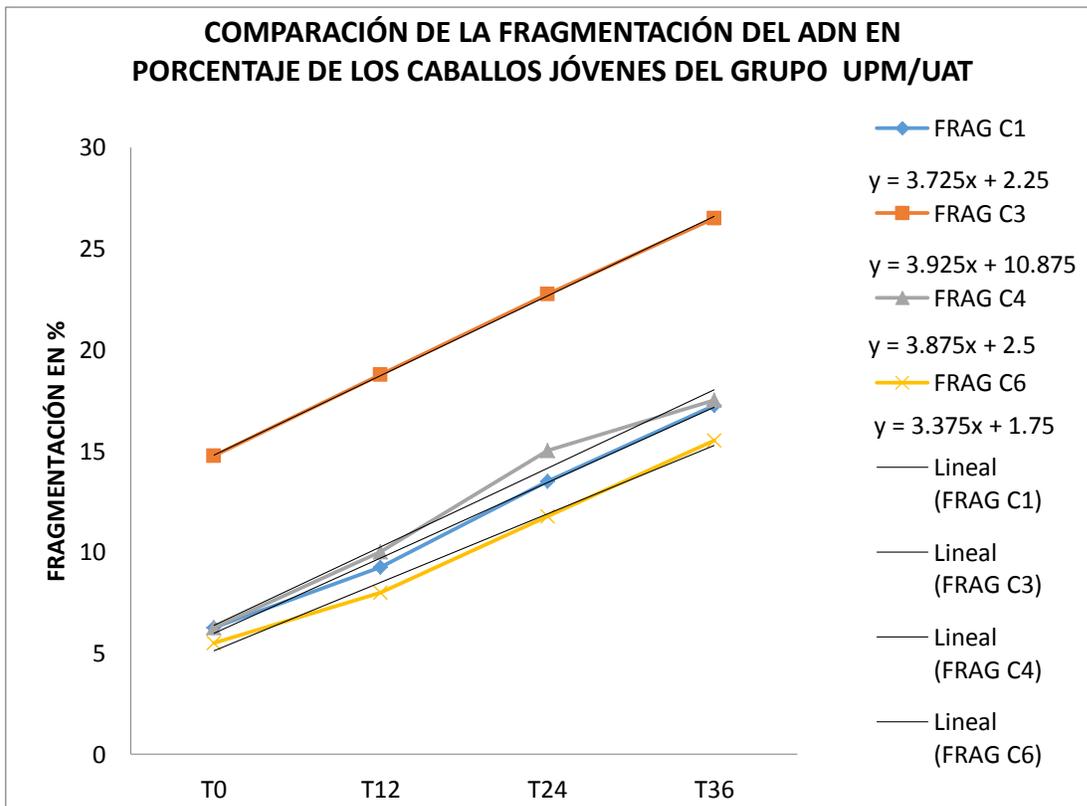
Frag.- Fragmentación del ADN **Lineal.-** línea de tendencia **T.-** tiempo

4.2.1.- COMPARACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PORCENTAJE DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LA UAT



Frag.- Fragmentación del ADN **Lineal.-** línea de tendencia **T.-** tiempo

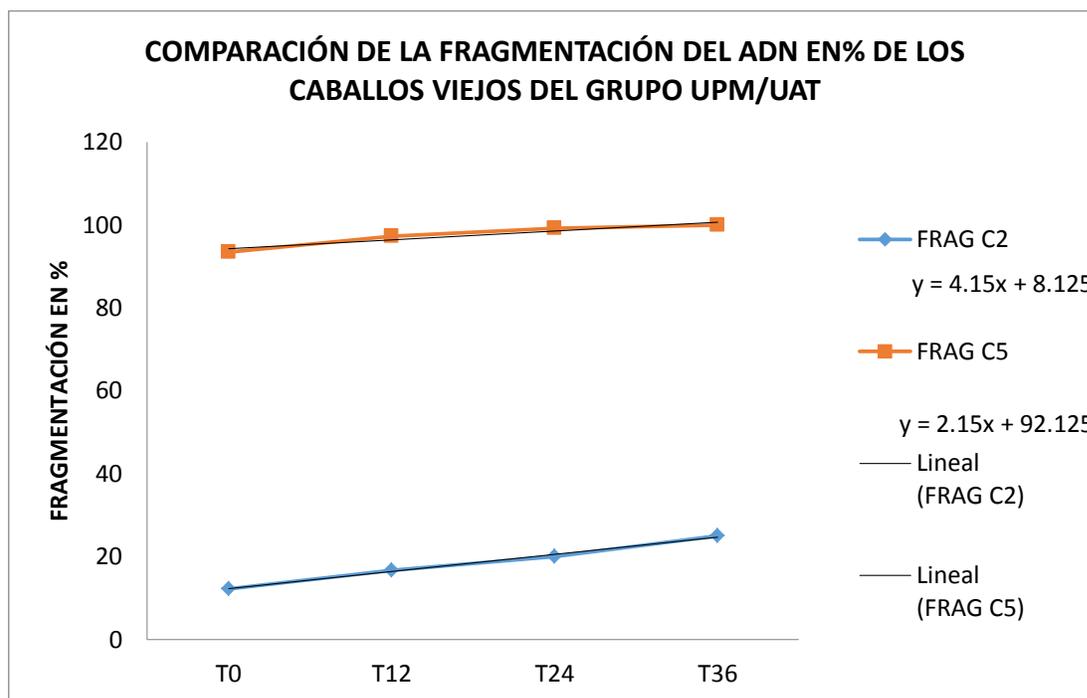
4.2.2.- COMPARACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PORCENTAJE DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT



Frag.- Fragmentación del ADN **Lineal.-** línea de tendencia **T.-** tiempo

El índice de dispersión de la cromatina de los caballos jóvenes C1, C4, C6 es muy similar pero el del caballo C3 es más alto conforme paso el tiempo del estudio

4.2.3.- COMPARACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN PORCENTAJE DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT



Frag.- Fragmentación del ADN **Lineal.-** línea de tendencia **T.-** tiempo

El índice de dispersión de la cromatina de los caballos viejos no es similar durante los tiempos del estudio

5.- DATOS DE MOTILIDAD, VIABILIDAD Y FRAGMENTACIÓN DE ADN

5.1.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD Y VIABILIDAD CON LOS DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN POR CABALLO

CABALLO Nº1			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	95%	85%	6.25%
T12	89%	83%	9.25%
T24	75%	65%	13.5%
T36	65%	60%	17.25%

CABALLO Nº2			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	66%	66%	12.25%
T12	13%	19%	16.75%
T24	7%	12%	20%
T36	3%	8%	25%

CABALLO Nº3			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	76%	77%	14.75%
T12	78%	79%	18.75%
T24	63%	65%	22.75%
T36	41%	45%	26.5%

CABALLO Nº4			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	94%	84%	6.25%
T12	79%	70%	10%
T24	78%	70%	15%
T36	61%	50%	17.5%

CABALLO Nº5			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	36%	43%	93.5%
T12	20%	24%	97.25%
T24	16%	20%	99.25%
T36	10%	15%	100%

CABALLO Nº6			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	94%	84%	5.50%
T12	79%	70%	8%
T24	68%	62%	11.75%
T36	55%	50%	15.50%

*Valores que se obtuvieron con la dilución 3 (D3: 1:3)

5.2.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MOTILIDAD Y VIABILIDAD CON LOS DE FRAGMENTACIÓN DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LOS CABALLOS DE LA UAT

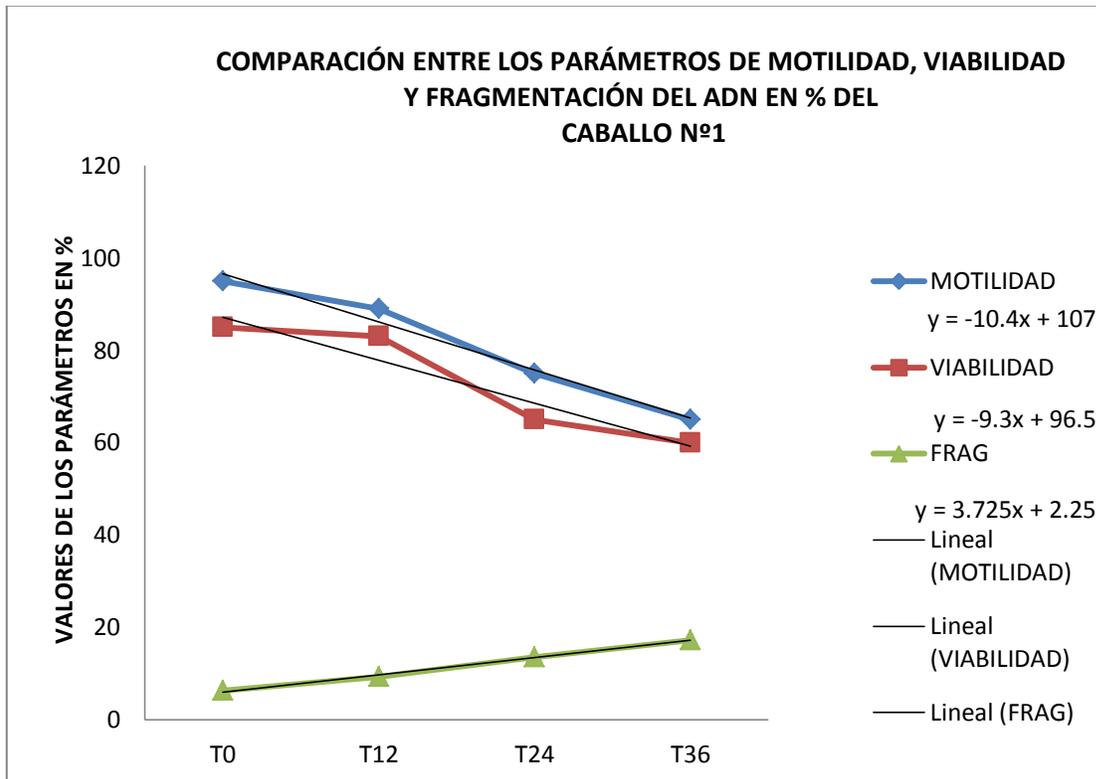
CABALLOS UPM			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	79%	76%	11%
T12	60%	60%	15%
T24	50%	47%	19%
T36	36%	37%	23%

CABALLOS UAT			
TIEMPO	MOTILIDAD*	VIABILIDAD*	FRAGMENTACIÓN
T0	75%	70%	35%
T12	55%	55%	38%
T24	54%	51%	42%
T36	42%	36%	44%

*Valores que se obtuvieron con la dilución 3 (D3: 1:3)

5.3.- PARÁMETROS DE MOTILIDAD, DE VIABILIDAD, COMPARADOS CON EL DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN PORCENTAJE POR TIEMPO Y POR CABALLO

(Fig. a, b, c, d, e, f, g)

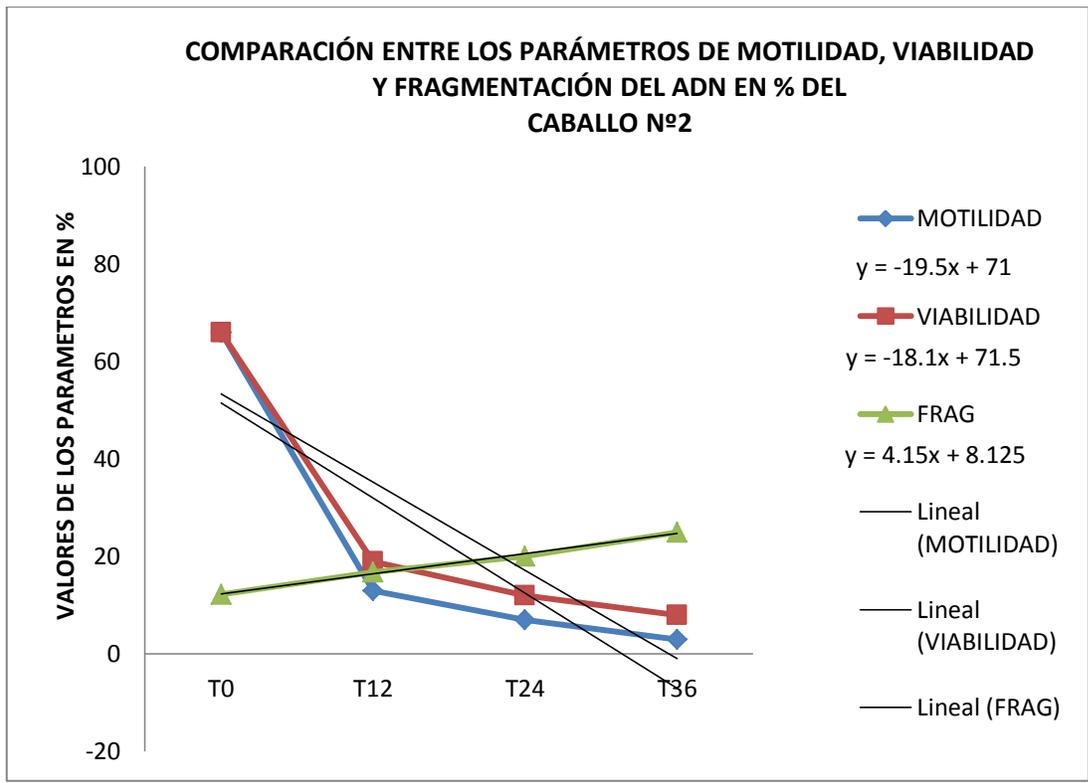


(Fig.a)

TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

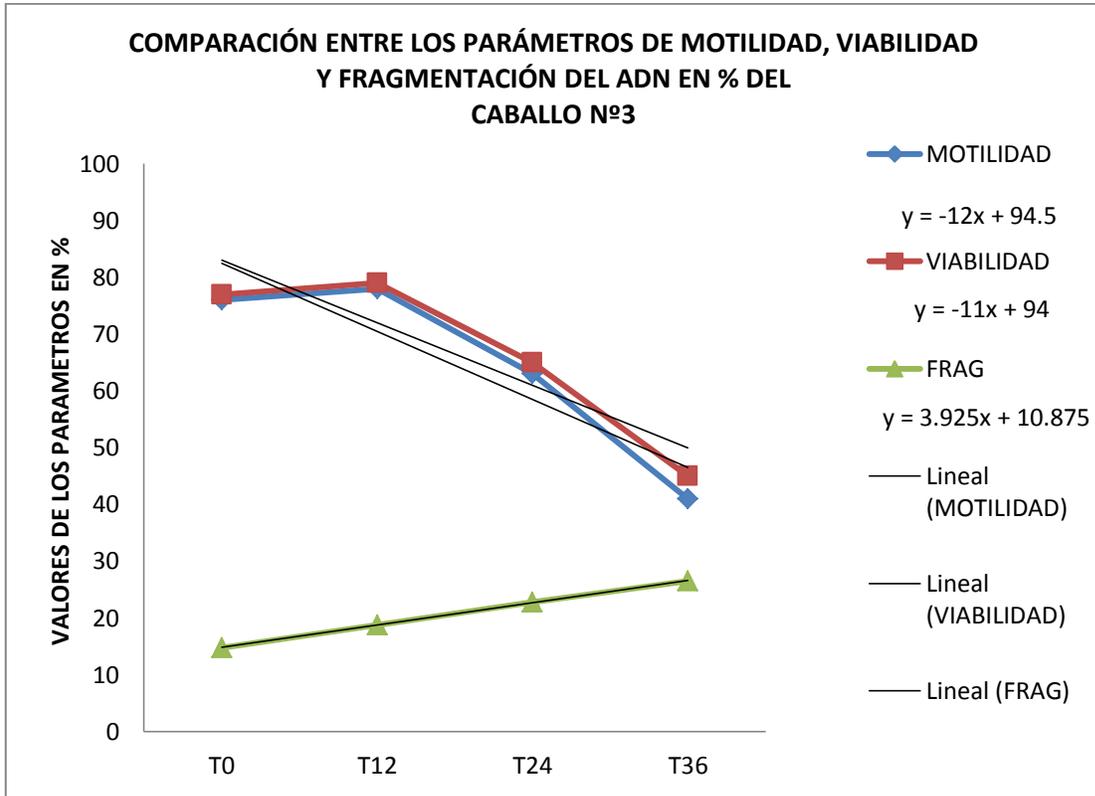


(Fig.b)

TIEMPO

T0.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

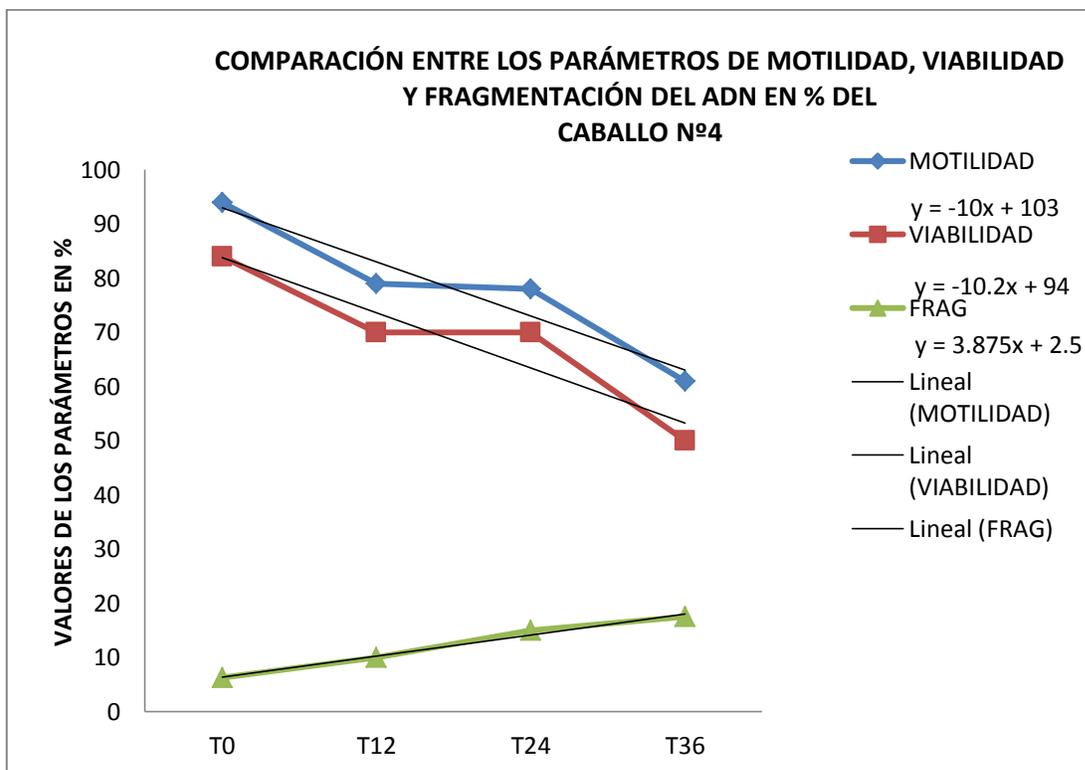


(Fig.c)

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.**- A las 12 horas* **T24.**- A las 24 horas* **T36.**- A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

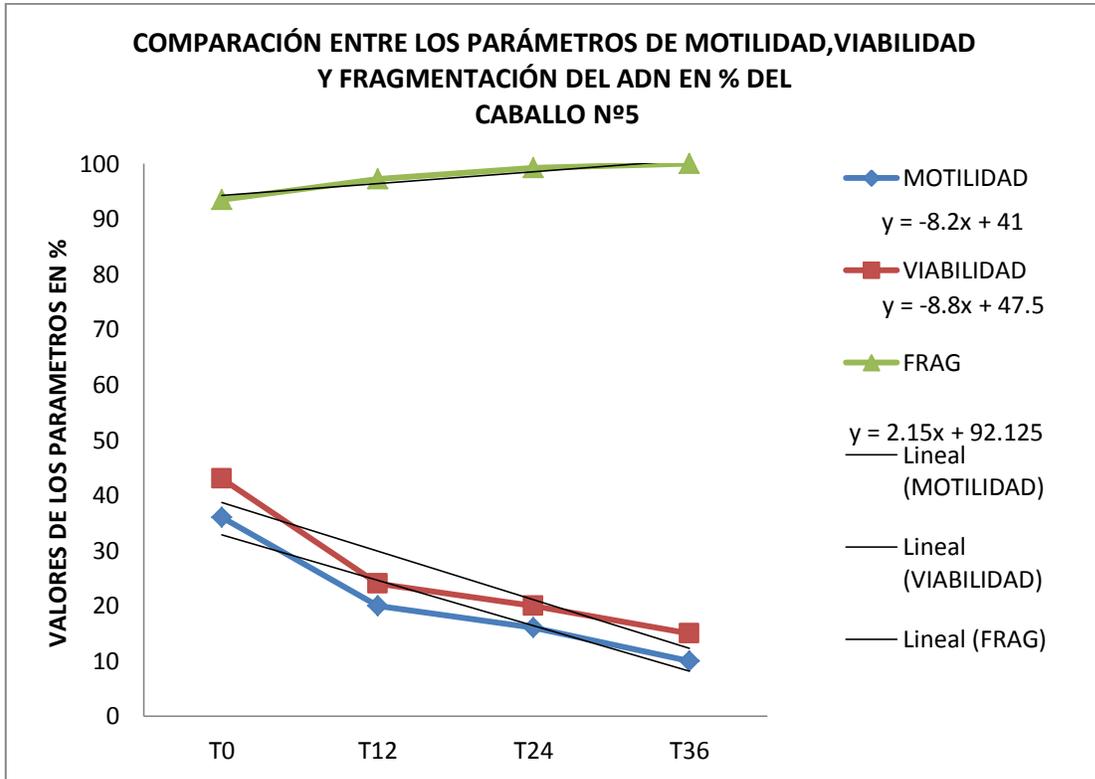


(Fig.d)

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

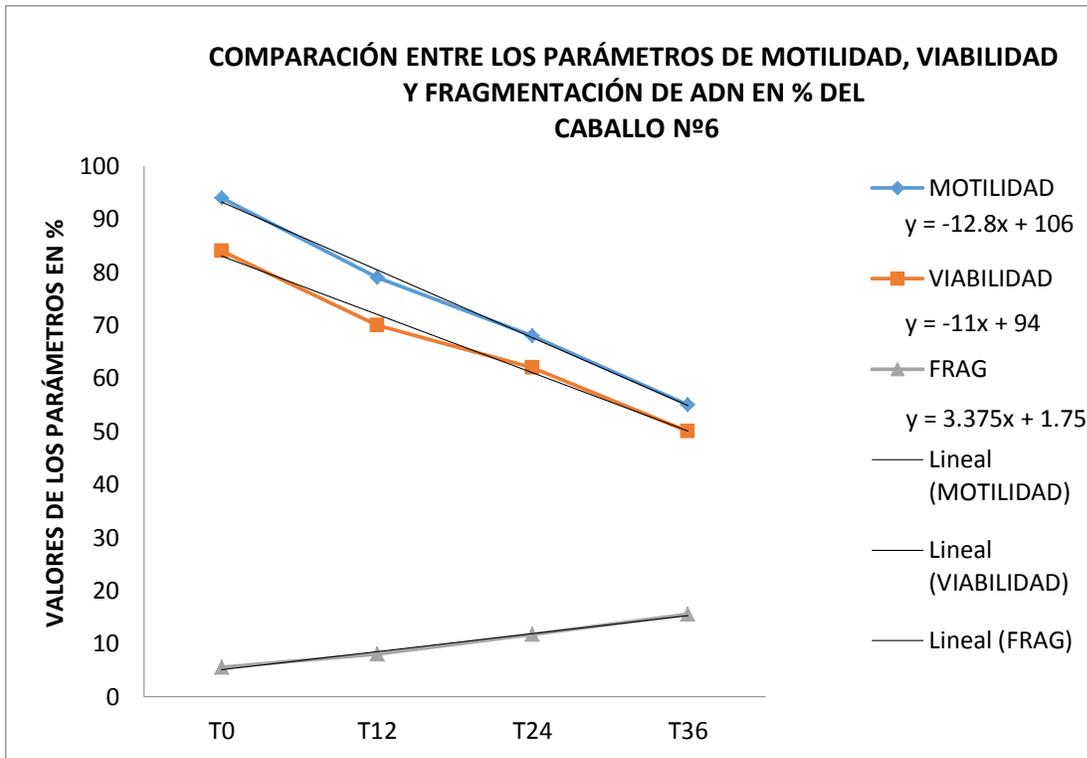


(Fig.e)

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación



(Fig.f)

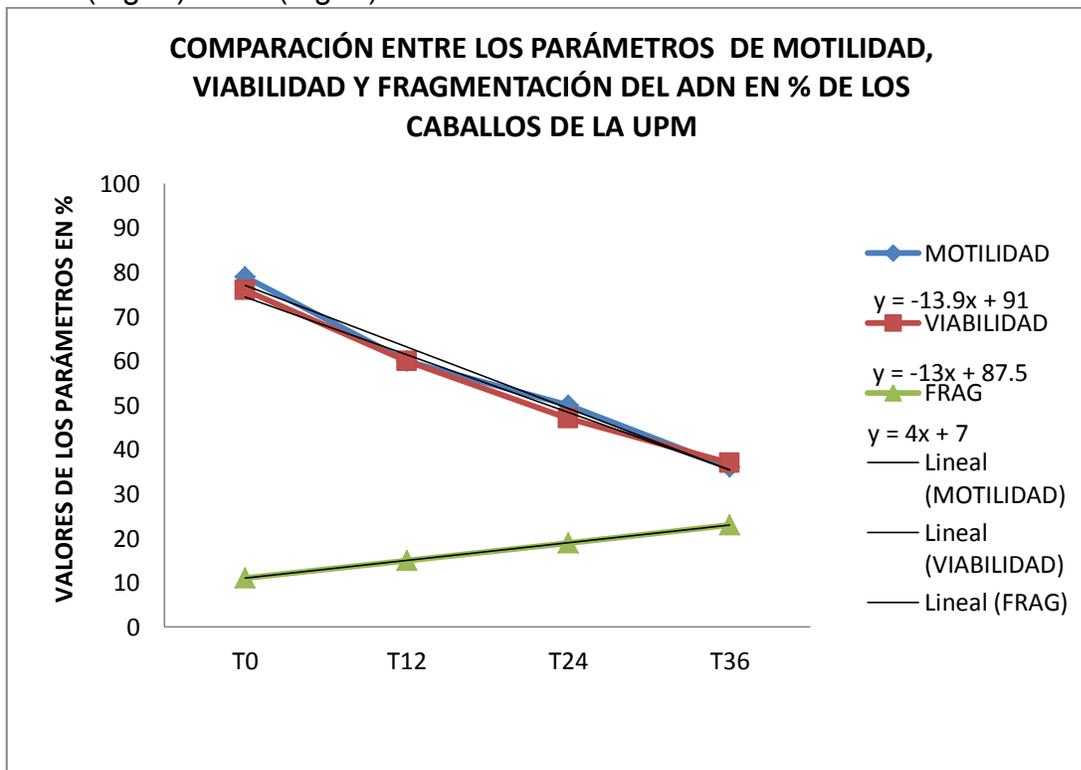
TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

5.4.- PARÁMETROS DE MOTILIDAD, DE VIABILIDAD, COMPARADOS CON EL DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN PORCENTAJE POR TIEMPO DE LOS CABALLOS DE LA UPM Y DE LOS CABALLOS DE LA UAT

UPM (Fig. a). UAT (Fig. b).



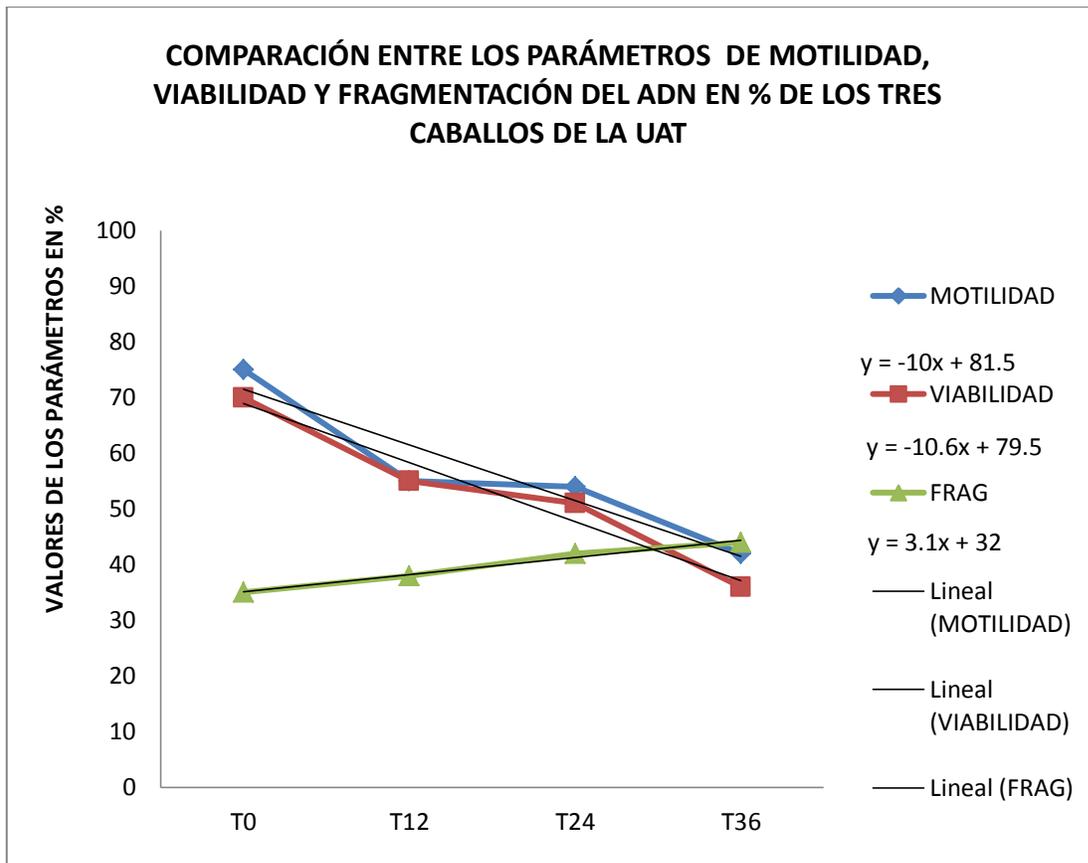
(Fig. a)

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México



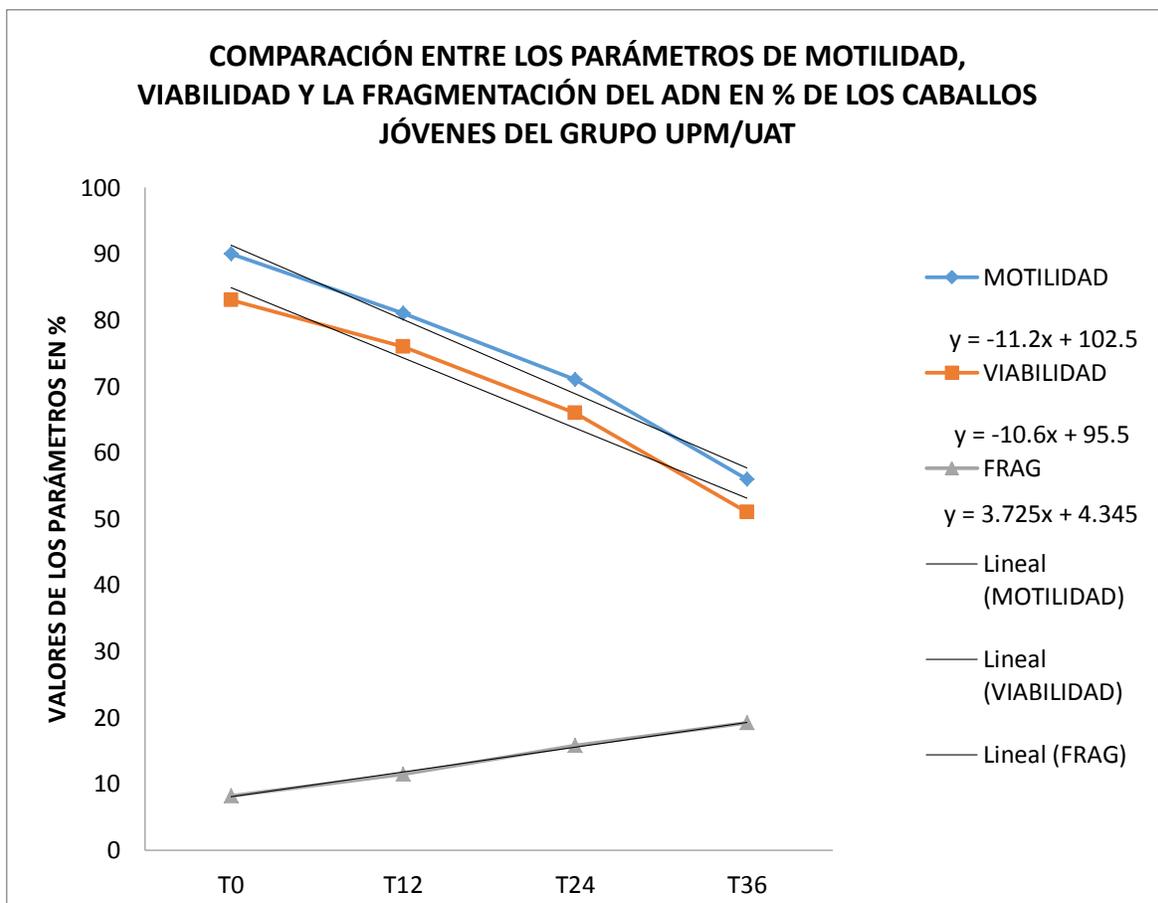
(Fig, b)

TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado) **FRAG.-**Fragmentación

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

5.5.- PARÁMETROS DE MOTILIDAD, DE VIABILIDAD, COMPARADOS CON EL DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN PORCENTAJE POR TIEMPO DE LOS CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

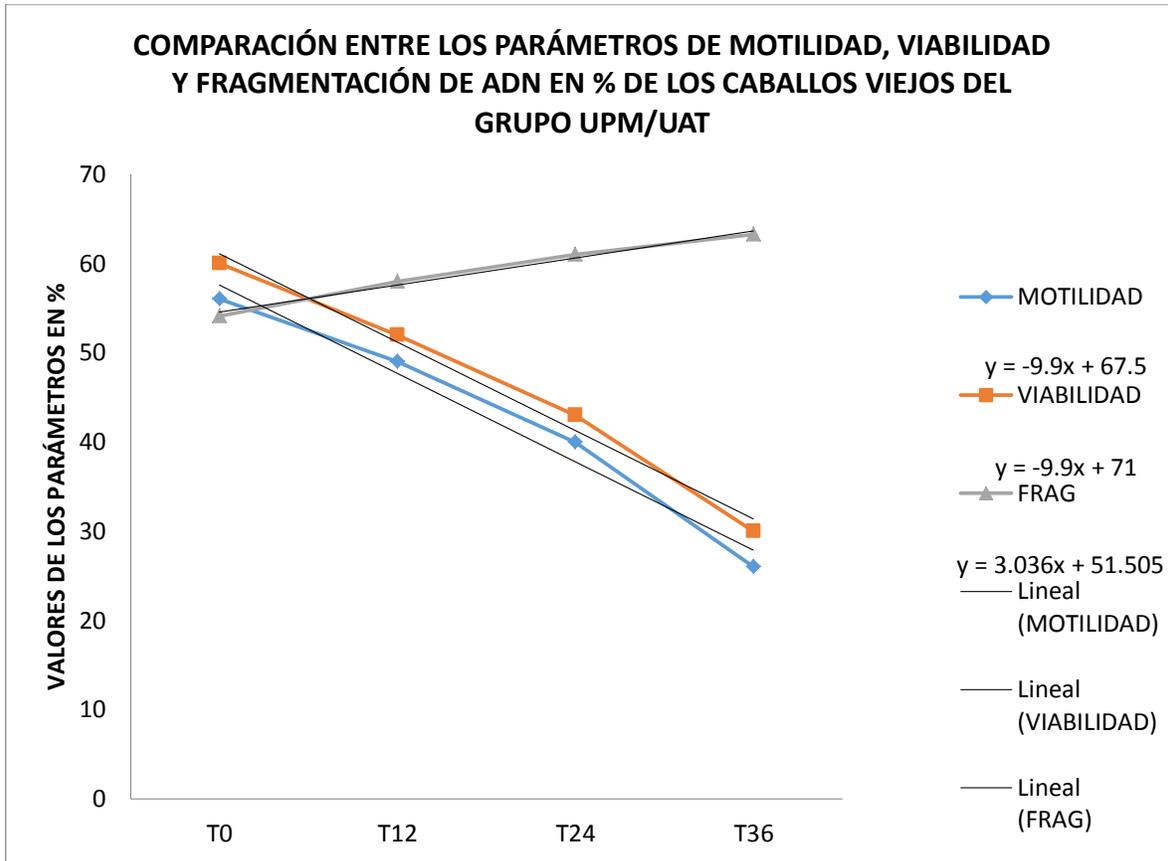
TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

5.6.- PARÁMETROS DE MOTILIDAD, DE VIABILIDAD, COMPARADOS CON EL DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN PORCENTAJE POR TIEMPO DE LOS CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT



TIEMPO

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado)

FRAG.- Fragmentación

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

Los parámetros de motilidad, de viabilidad con los de fragmentación del ADN tienen una correlación negativa

B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE SUPERVIVENCIA CON EL MÉTODO DE KAPLAN MEIER

(COMPARACIÓN CON EL TEST DE Log Rank) Significancia $P=0.05$

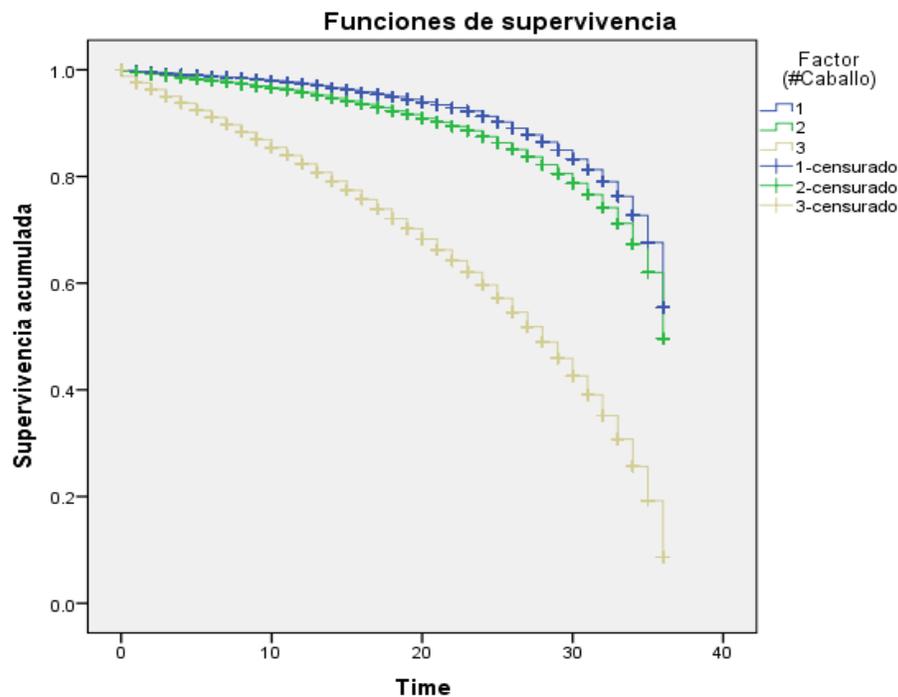
UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.-Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

1.-CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD. DE MÉXICO (UPM)

1.1.- MONTA N°1 UPM

CABALLO N°1: 9 años, CABALLO N°2: 19 años, CABALLO N°3: 7 años.



RESULTADOS: Monta n°1. Caballos de la UPM.

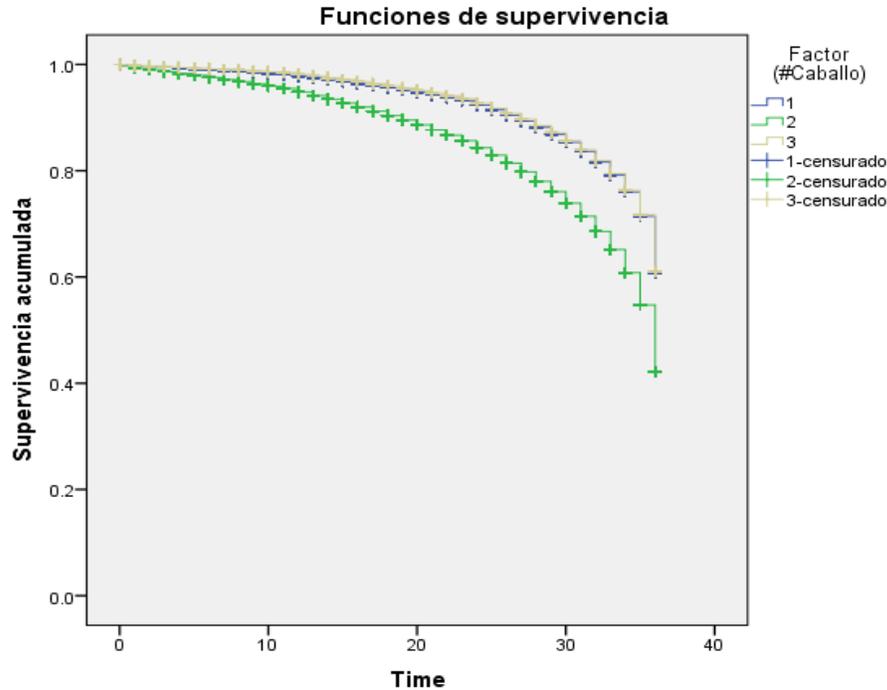
Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UPM.

Hay una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°3 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

1.2.- MONTA N°2 UPM

CABALLO N°1: 9 años, **CABALLO N°2:** 19 años, **CABALLO N°3:** 7 años.



RESULTADOS: Monta n°2. Caballos UPM.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UPM.

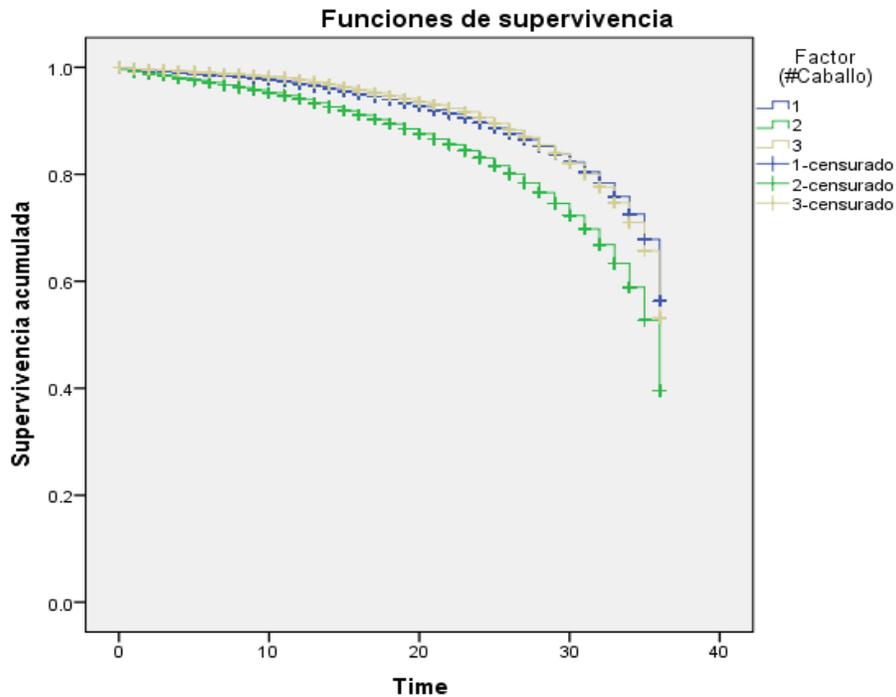
No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre el caballo n°1 con el caballo n°3

Sin embargo si hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

1.3.- MONTA N°3 UPM

CABALLO N°1: 9 años, **CABALLO N°2:** 19 años, **CABALLO N°3:** 7 años.



RESULTADOS: Monta n°3. Caballos UPM.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UPM.

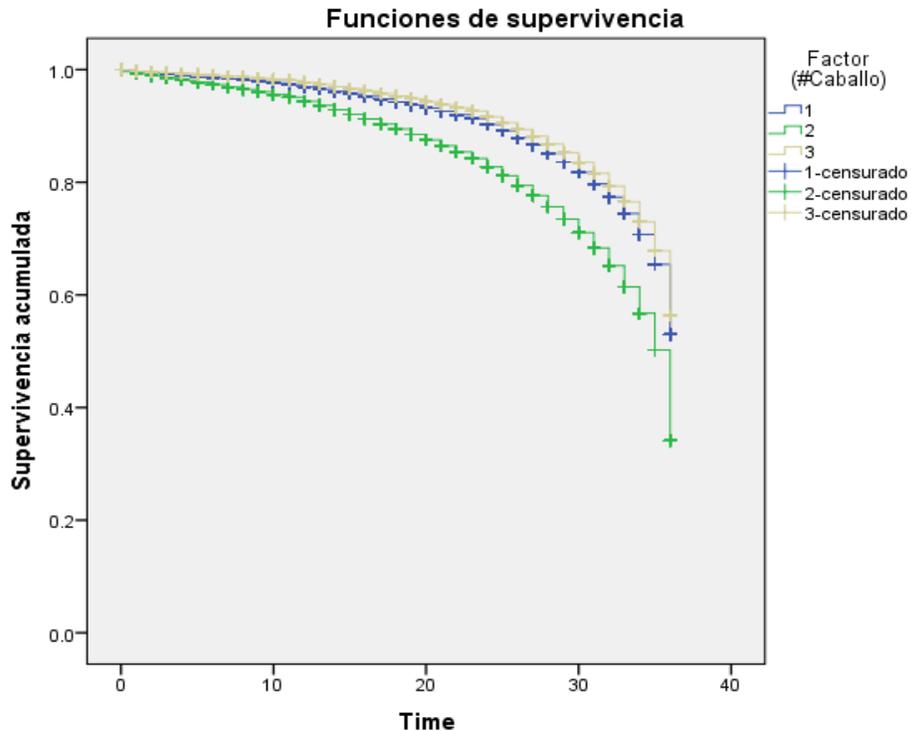
No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre el caballo n°1 con el caballo n°3.

Sin embargo si hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

1.4.- MONTA N°4 UPM

CABALLO N°1: 9 años, **CABALLO N°2:** 19 años, **CABALLO N°3:** 7 años.



RESULTADOS: Monta n°4. Caballos UPM.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UPM.

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre el caballo n°1 con el caballo n°3.

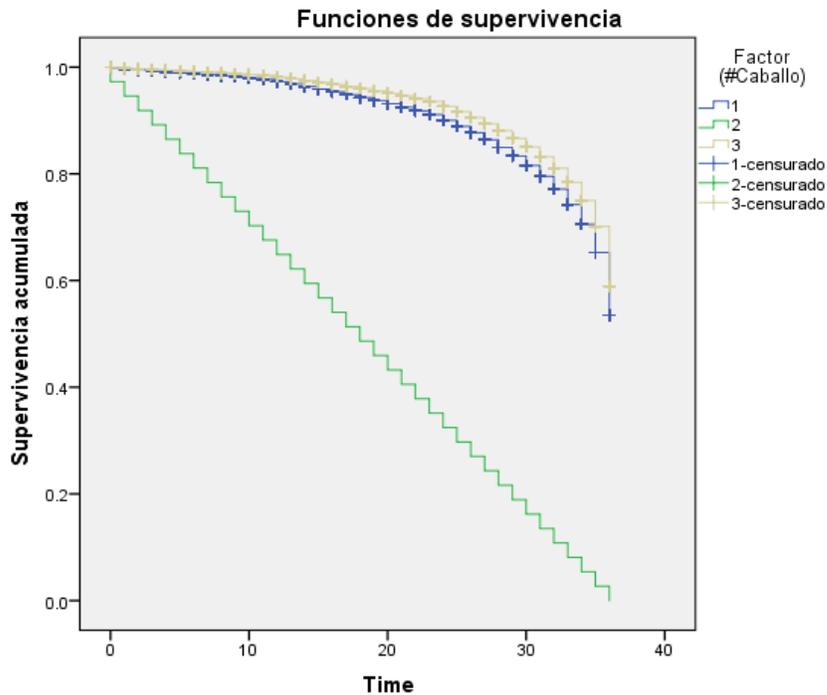
Sin embargo si hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

2.- CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT)

2.1.- MONTA N°1 UAT

CABALLO N°1: 5 años, CABALLO N°2: 18 años, CABALLO N°3: 3años.



RESULTADOS: Monta n°1. Caballos UAT.

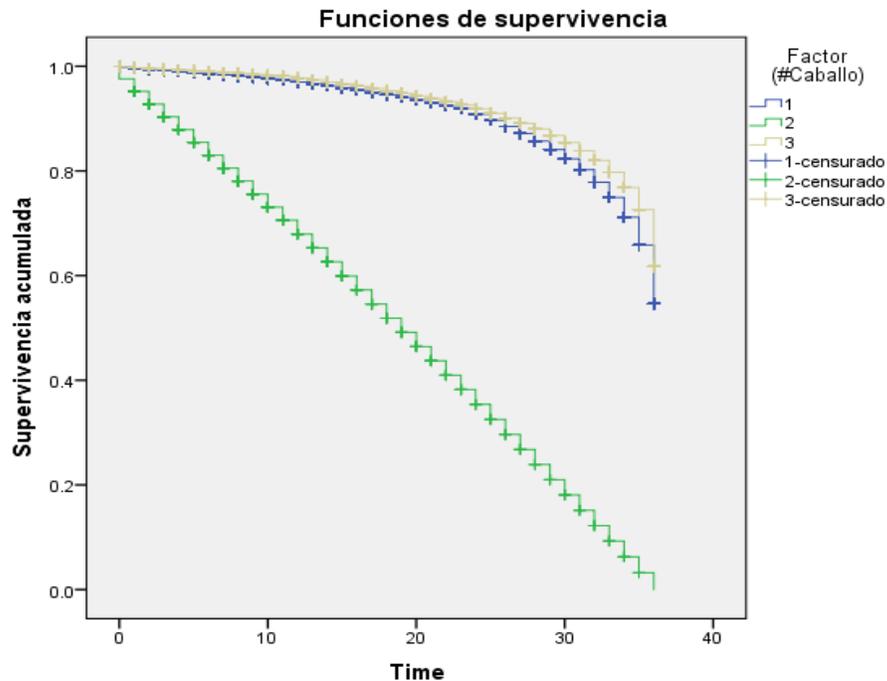
Existe una diferencia significativa entre el índice de frgamentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

2.2.- MONTA N°2 UAT

CABALLO N°1: 5 años, **CABALLO N°2:** 18 años, **CABALLO N°3:** 3años.



RESULTADOS: Monta n°2. Caballos UAT.

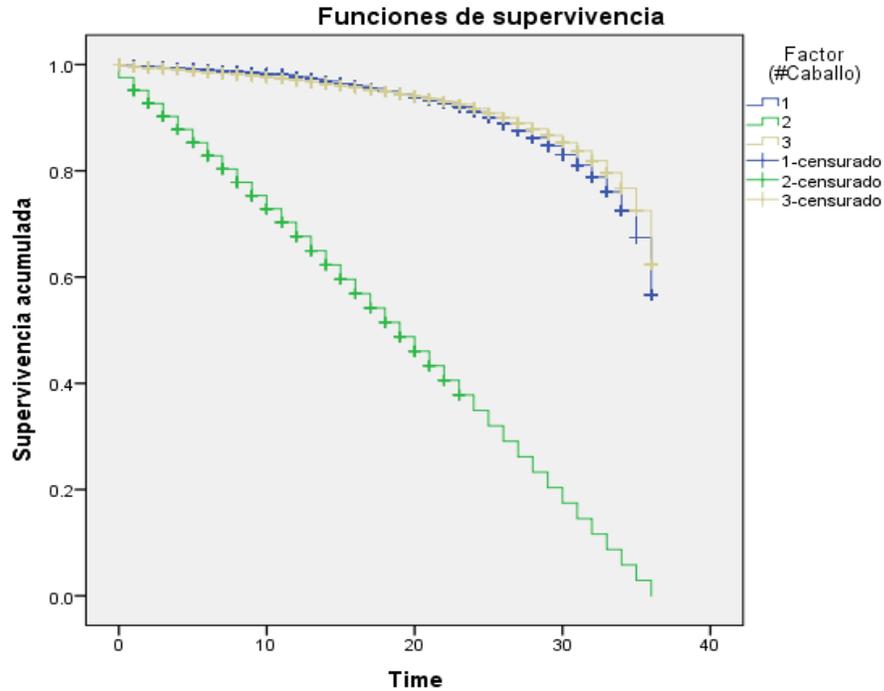
Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

2.3.- MONTA N°3 UAT

CABALLO N°1: 5 años, **CABALLO N°2:** 18 años, **CABALLO N°3:** 3años.



RESULTADOS: Monta n°3. Caballos UAT.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UAT.

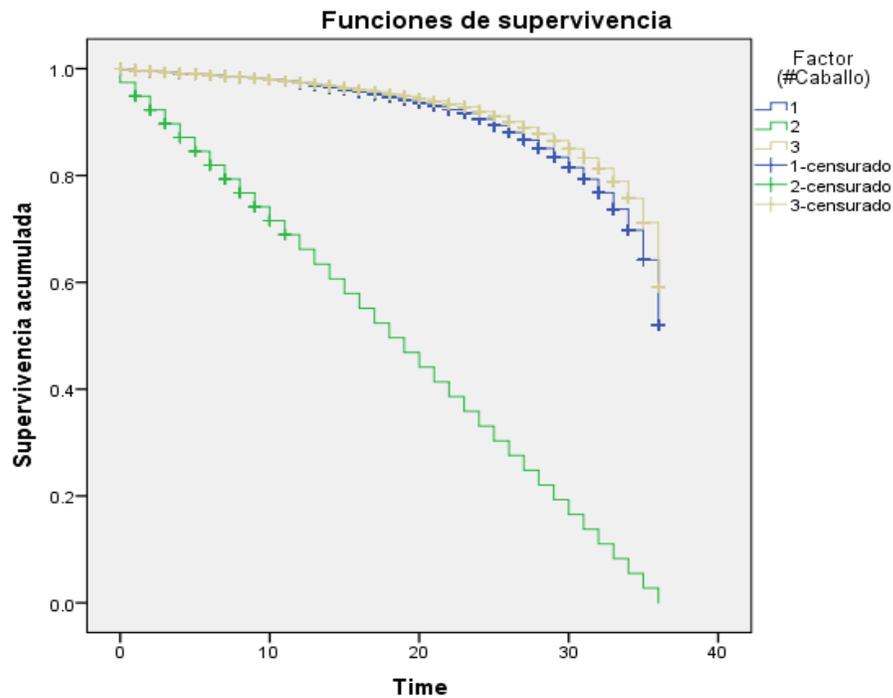
Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°2 con el caballo n°1
- El caballo n°2 con el caballo n°3

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre el caballo n°1 con el caballo n°3.

2.4.- MONTA N°4 UAT

CABALLO N°1: 5 años, **CABALLO N°2:** 18 años, **CABALLO N°3:** 3 años.



RESULTADOS: Monta n°4. Caballos UAT.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los tres caballos de la UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°2
- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°2 con el caballo n°3

3.- COMPARACIÓN ENTRE LOS CABALLOS DE LA UPM Y LOS CABALLOS DE LA UAT

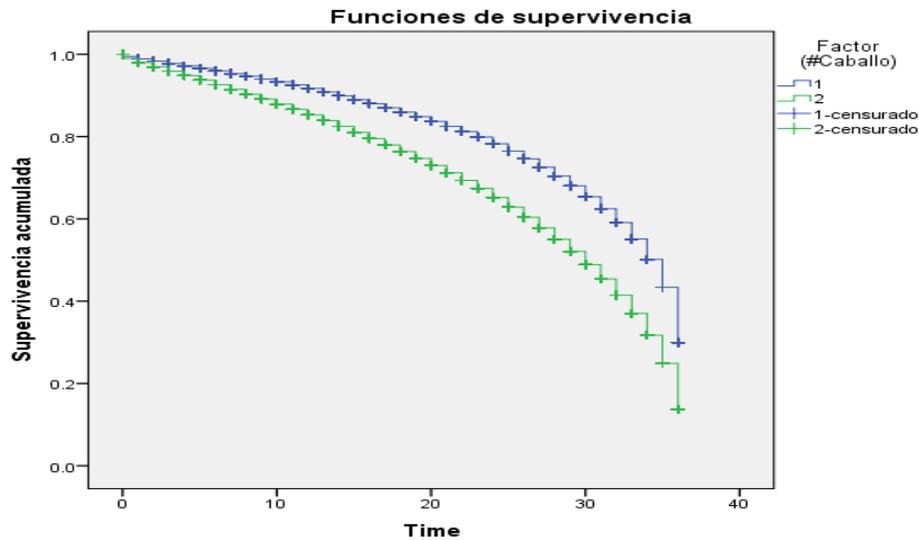
NOTA:

El caballo n°1 representa el promedio de los caballos de la UPM.

El caballo n°2 representa el promedio de los caballos de la UAT.

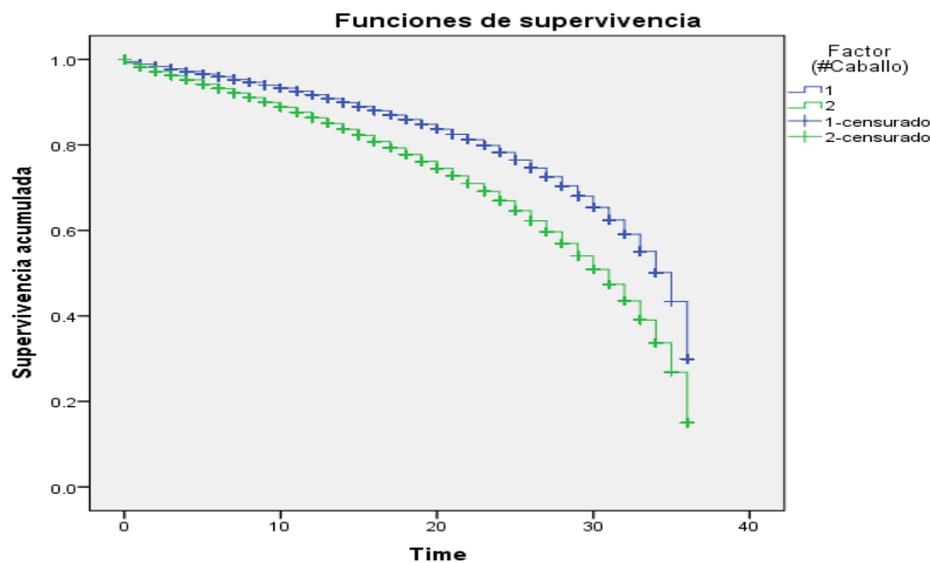
3.1.- MONTA N°1 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).



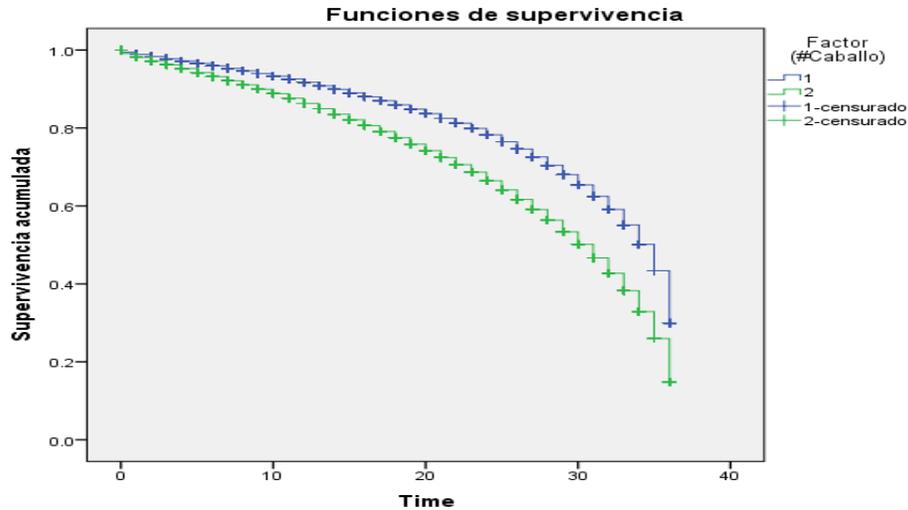
3.2.- MONTA N°2 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).



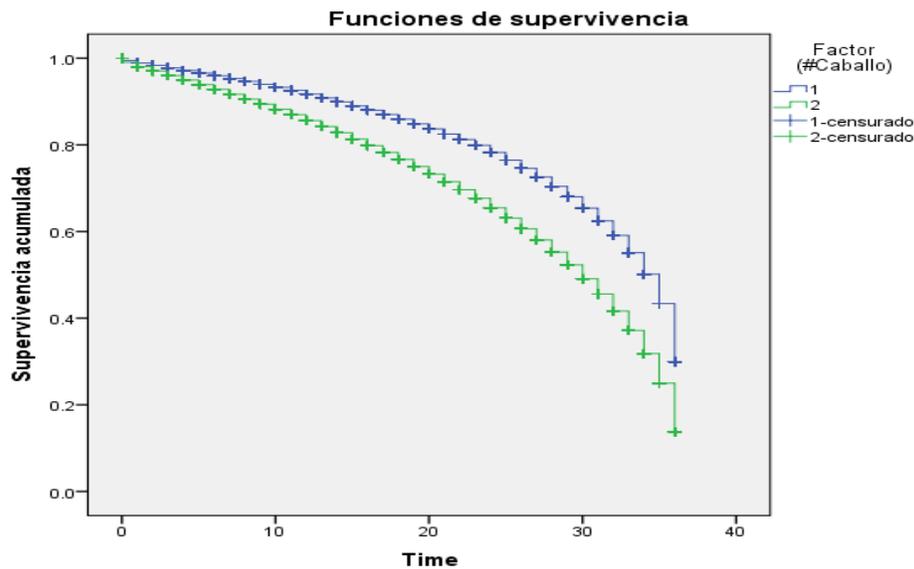
3.3.- MONTA N°3 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).



3.4.- MONTA N°4 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).



RESULTADOS DE LAS 4 MONTAS UPM/UAT

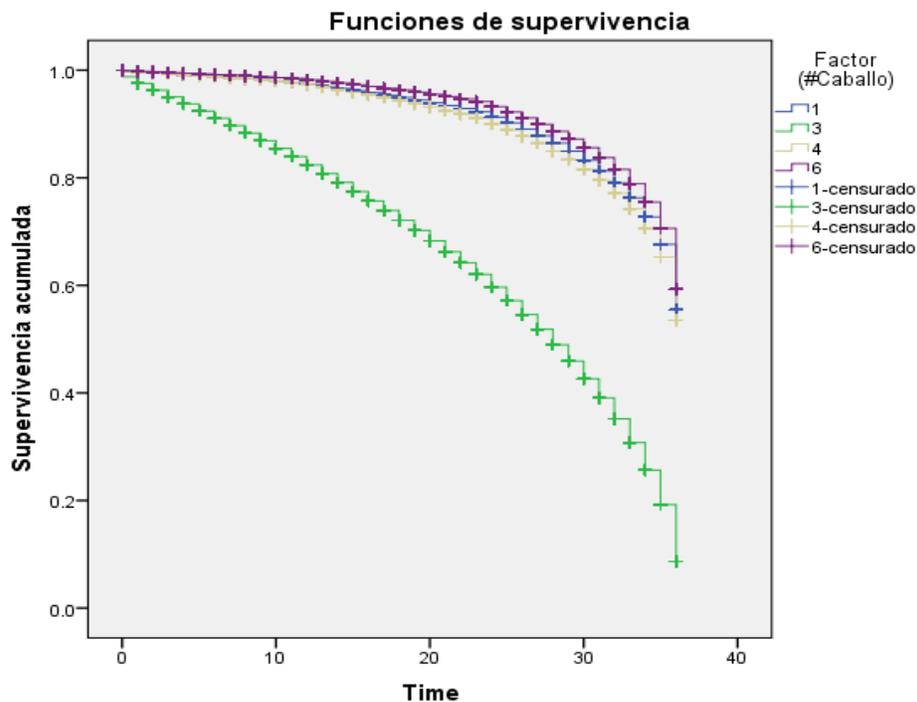
Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre de la UPM y los caballos de la UAT en las cuatro montas

4.- CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

4.1.- MONTA N°1. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, CABALLO N°3: 7 años, CABALLO N°4: 5 años.

CABALLO N°6: 3 años.



RESULTADOS: Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°1.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

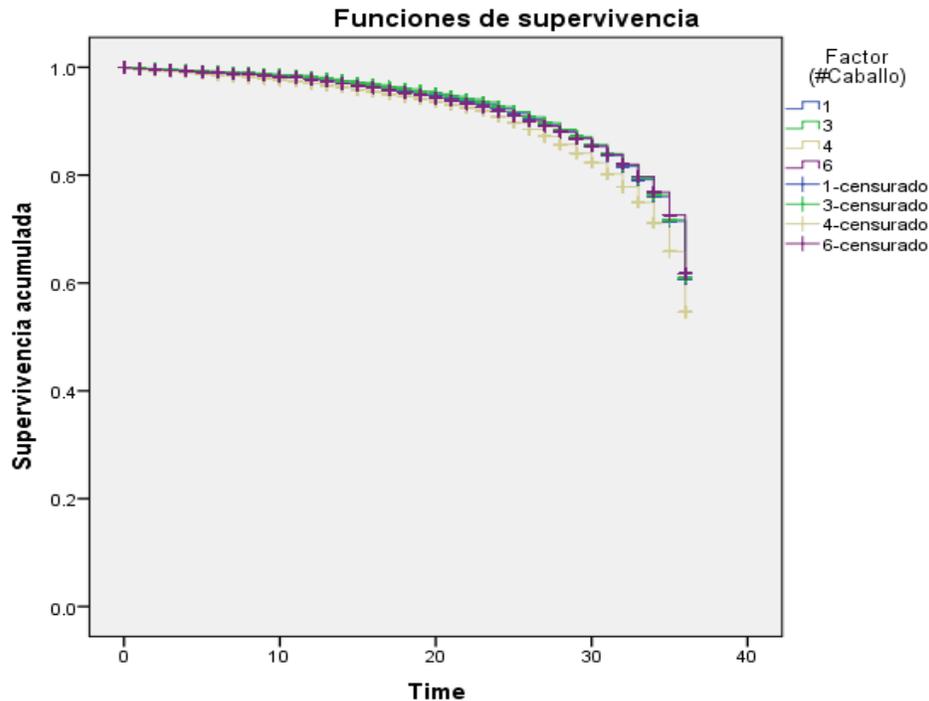
- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°1 con el caballo n°6
- El caballo n°3 con el caballo n°4
- El caballo n°3 con el caballo n° 6
- El caballo n°4 con el caballo n°6

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre el caballo n°1 con el caballo n°4.

4.2.- MONTA N°2. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, **CABALLO N°3:** 7 años, **CABALLO N°4:** 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.



RESULTADOS: Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°4
- El caballo n°3 con el caballo n°4
- El caballo n°4 con el caballo n°6

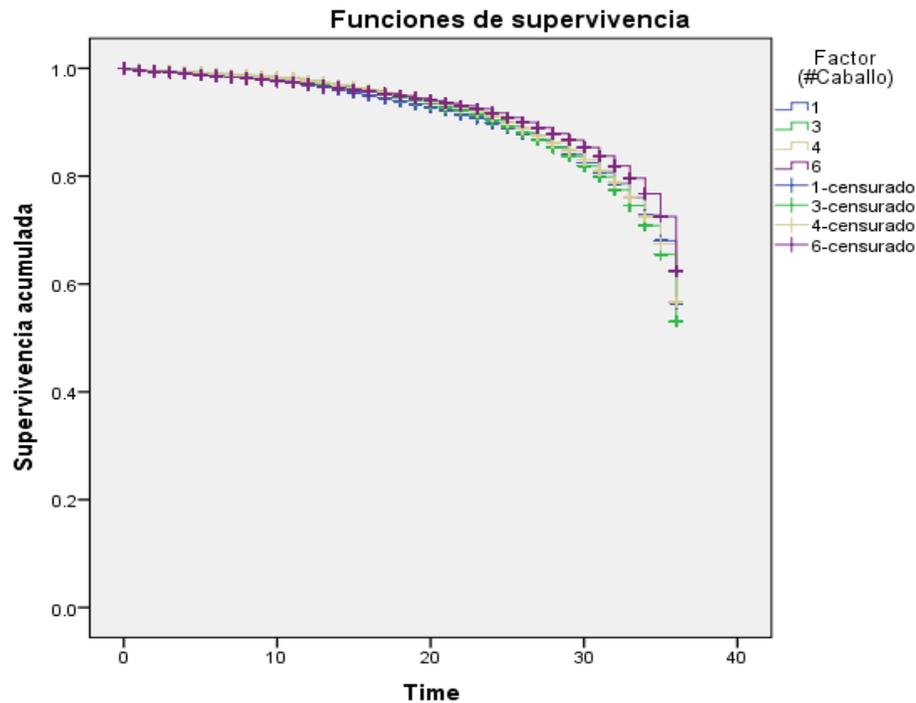
No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°1 con el caballo n°6
- El caballo n°3 con el caballo n°6

4.3.- MONTA N°3. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, **CABALLO N°3:** 7 años, **CABALLO N°4:** 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.



RESULTADOS: Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°6
- El caballo n°3 con el caballo n°6

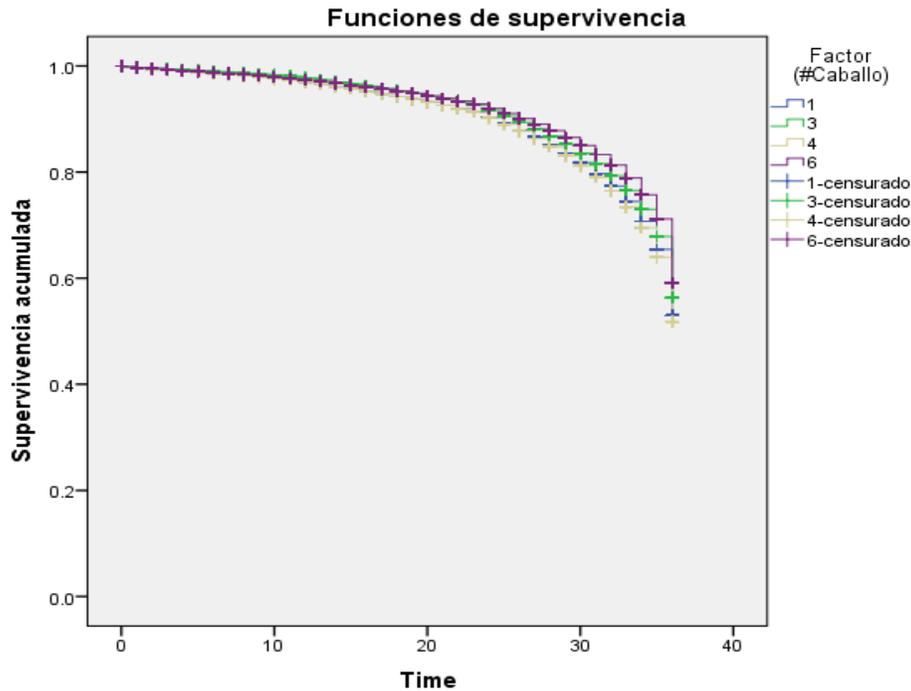
No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°1 con el caballo n°4
- El caballo n°3 con el caballo n°4
- El caballo n°4 con el caballo n°6

4.4.- MONTA N°4. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, **CABALLO N°3:** 7 años, **CABALLO N°4:** 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.



RESULTADOS: Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los caballos jóvenes del grupo experimental UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con el caballo n°6
- El caballo n°3 con el caballo n°4
- El caballo n°4 con el caballo n°6

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

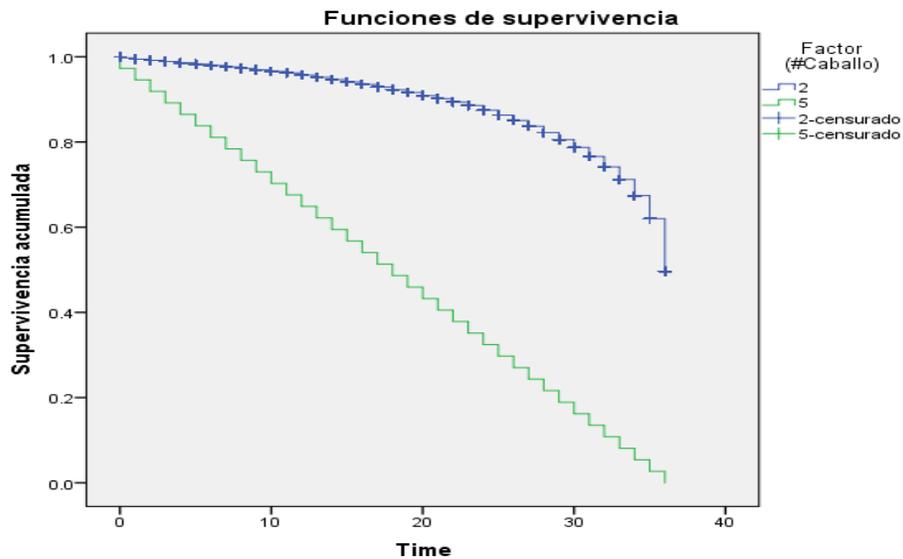
- El caballo n°1 con el caballo n°3
- El caballo n°1 con el caballo n°4
- El caballo n°3 con el caballo n°6

5.- CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).

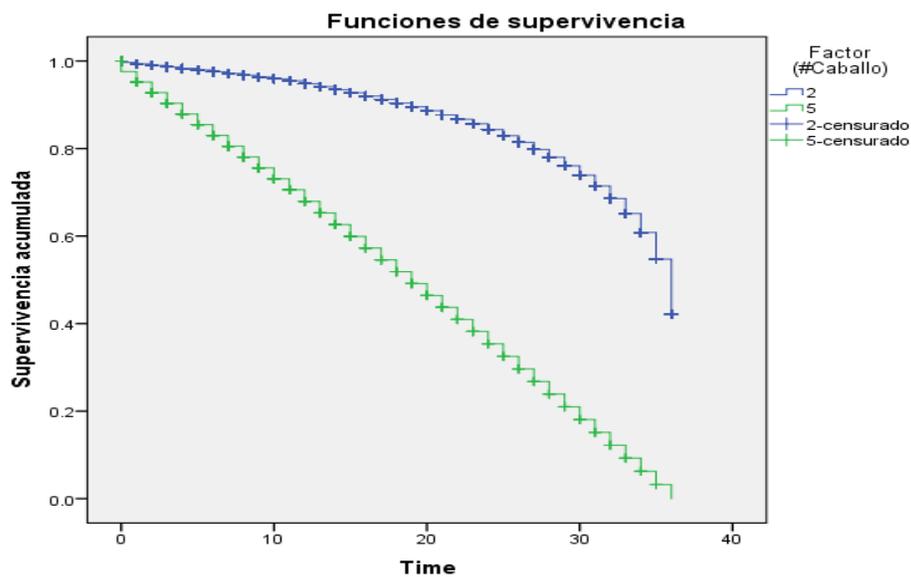
5.1.- MONTA N°1. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).



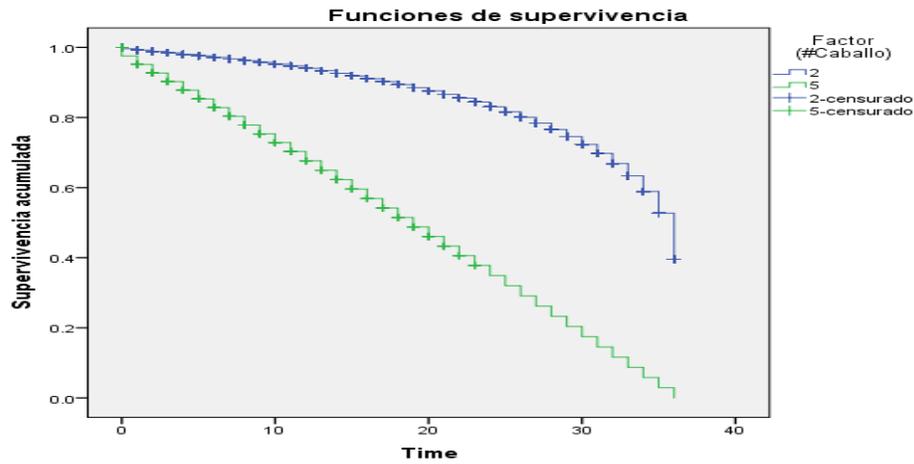
5.2.- MONTA N°2. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).



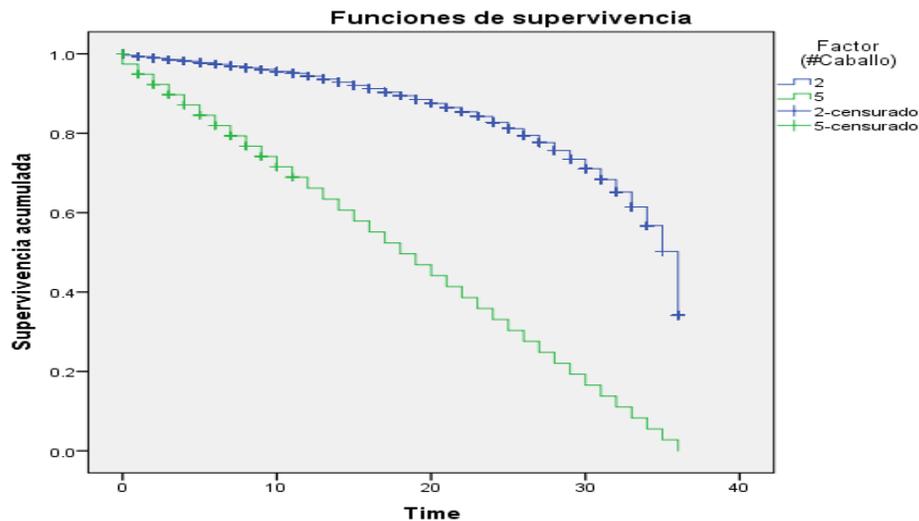
5.3.- MONTA N°3. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).



5.4.- MONTA N°4. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT)



RESULTADOS DE LAS CUATRO MONTAS. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

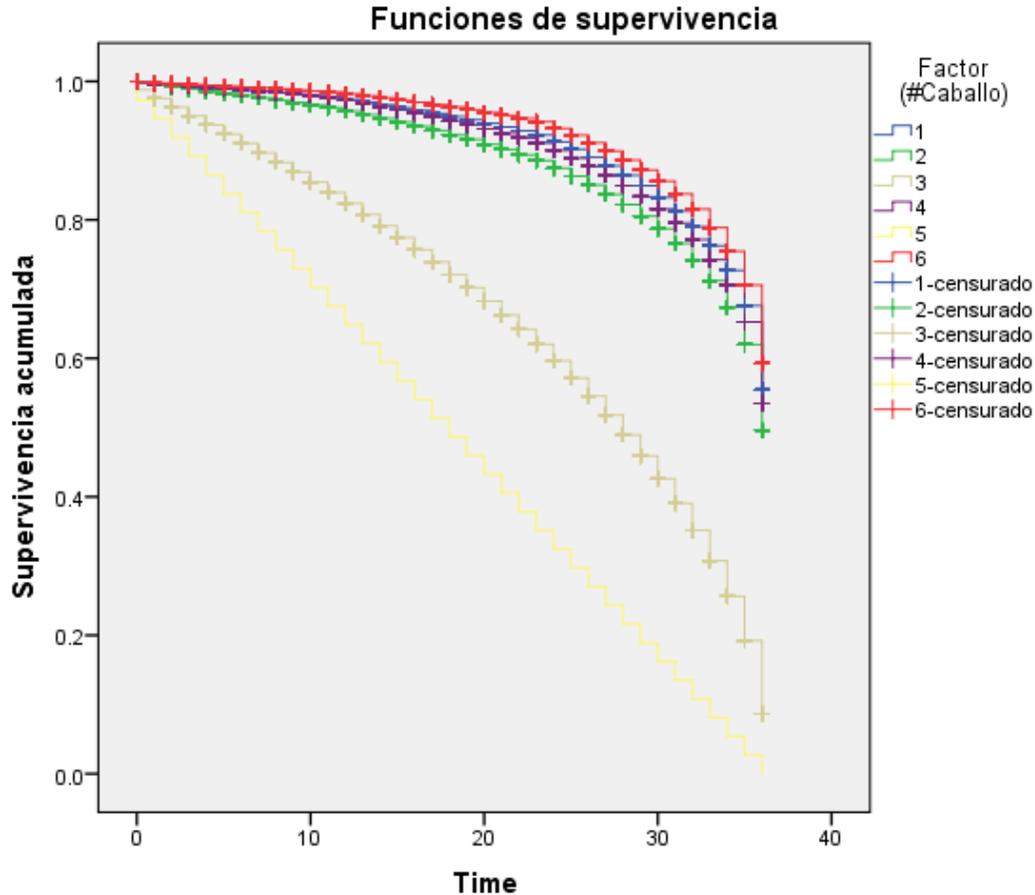
Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de los caballos viejos del grupo UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre los caballos de la UPM con los caballos de la UAT en las cuatro montas.

6.- TODOS LOS CABALLOS DEL GRUPO UPM/UAT

6.1.- MONTA N°1. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.



RESULTADOS: De todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montañ n°1.

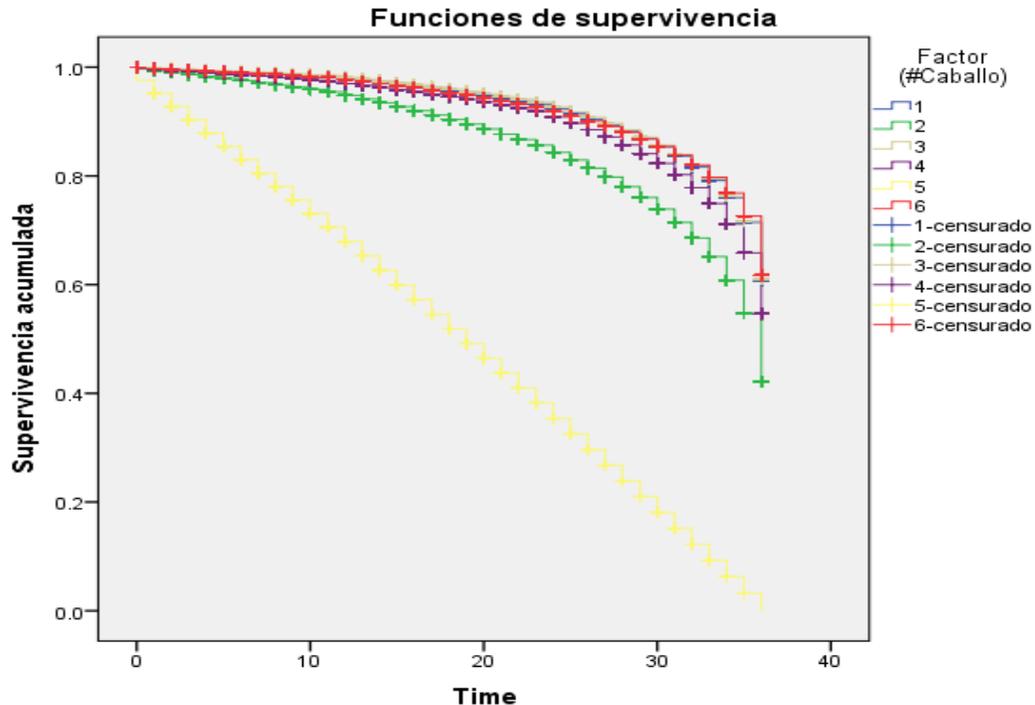
Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de todos los caballos del grupo UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con los caballos n°2,3,4,5,6
- El caballo n°2 con los caballos n°1,3,4,5,6
- El caballo n°3 con los caballos n°1,2,4,5,6
- El caballo n°4 con los caballos n°1,2,3,5,6
- El caballo n°5 con los caballos n°1,2,3,4,6
- El caballo n°6 con los caballos n°1,2,3,4,5

6.2.- MONTA N°2. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.



RESULTADOS: Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de todos los caballos del grupo UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

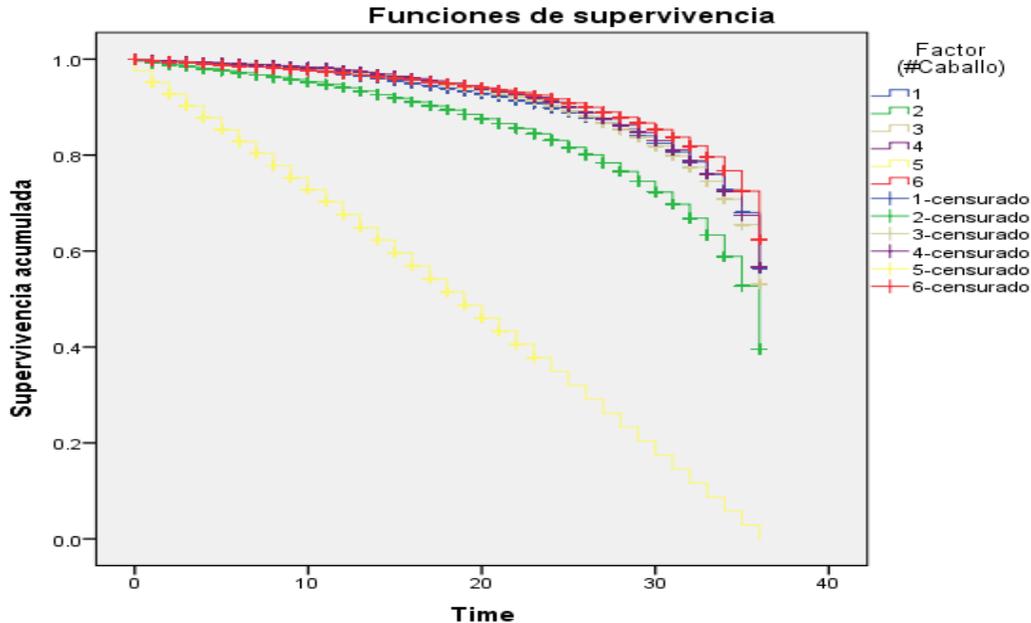
- El caballo n°1 con los caballos n°2,4,5
- El caballo n°2 con los caballos n°1,3,4,5,6
- El caballo n°3 con los caballos n°2,4,5
- El caballo n°4 con los caballos n°1,2,3,5,6
- El caballo n°5 con los caballos n°1,2,3,4,6
- El caballo n°6 con los caballos n°2,4,5

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con los caballos n°3,6
- El caballo n°3 con los caballos n°1,6
- El caballo n°6 con los caballos n°1,3

6.3.- MONTA N°3. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde **CABALLO N°3:** 7años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.



RESULTADOS: Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de todos los caballos del grupo UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

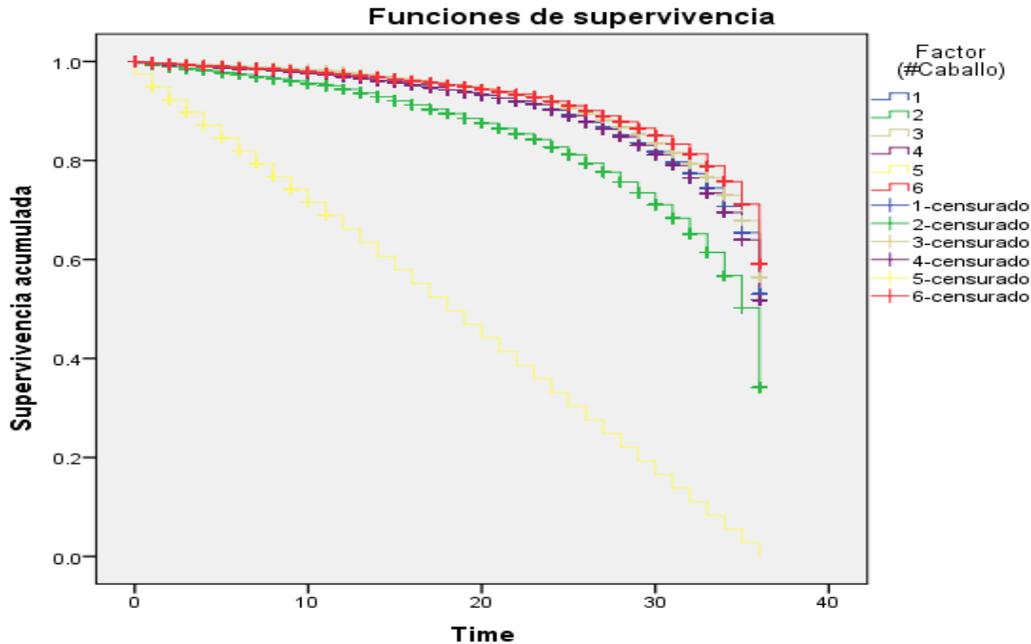
- El caballo n°1 con los caballos n°2,5,6
- El caballo n°2 con los caballos n°1,3,5,6
- El caballo n°3 con los caballos n°2,5,6
- El caballo n°4 con los caballos n°2,5
- El caballo n°5 con los caballos n°1,2,3,4,6
- El caballo n°6 con los caballos n°1,2,3,5

No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con los caballos n°3,4
- El caballo n°2 con el caballo n°4
- El caballo n°3 con los caballos n°1,4
- El caballo n°4 con los caballos n°1,3,6
- El caballo n°6 con el caballo n°5

6.4.- MONTA N°4. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.



RESULTADOS: Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

Existe una diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados de todos los caballos del grupo UPM/UAT.

Hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con los caballos n°2,5,6
- El caballo n°2 con los caballos n°1,3,5,6
- El caballo n°3 con los caballos n°2,4,5,6
- El caballo n°4 con los caballos n°2,3,5,6
- El caballo n°5 con los caballos n°1,2,3,4,6
- El caballo n°6 con los caballos n°1,2,4,5

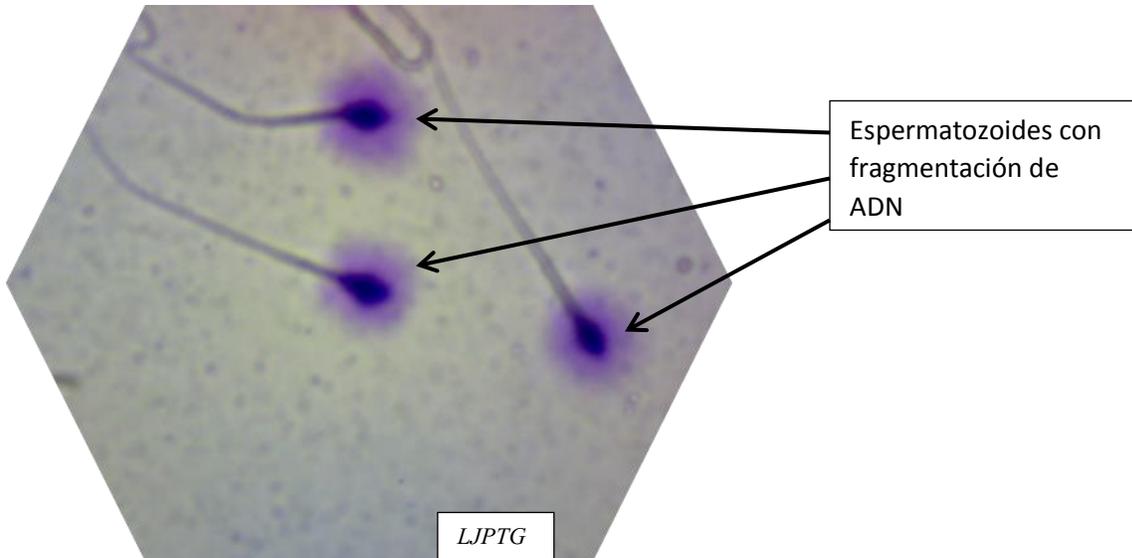
No hay diferencia significativa entre el índice de fragmentación del ADN de los eyaculados entre:

- El caballo n°1 con los caballos n°3,4
- El caballo n°3 con el caballo n°1
- El caballo n°4 con los caballos n°2,3,5,6
- El caballo n°6 con el caballo n°3

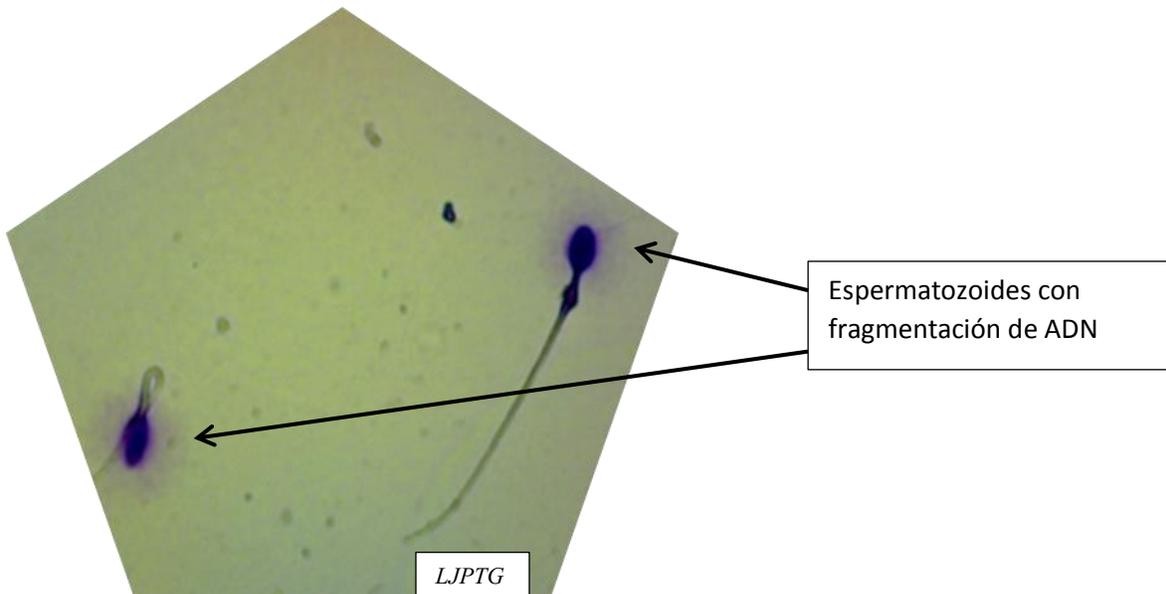
C) REGISTRO GRÁFICO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS SEIS SEMENTALES CON O SIN DISPERSIÓN DE LA CROMATINA

Espermatozoides teñidos con la tinción de DIFF QUIK, observados con el microscopio óptico de campo claro con 1000 aumentos y con aceite de inmersión.

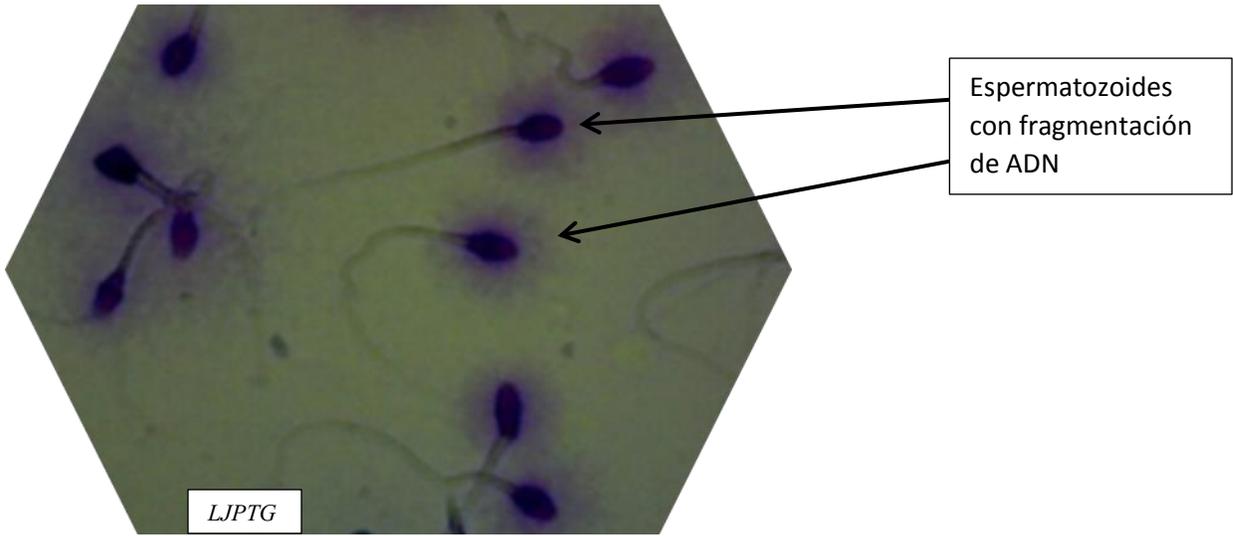
**1.- CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD. DE MÉXICO (UPM)
CABALLO Nº1**



CABALLO Nº2

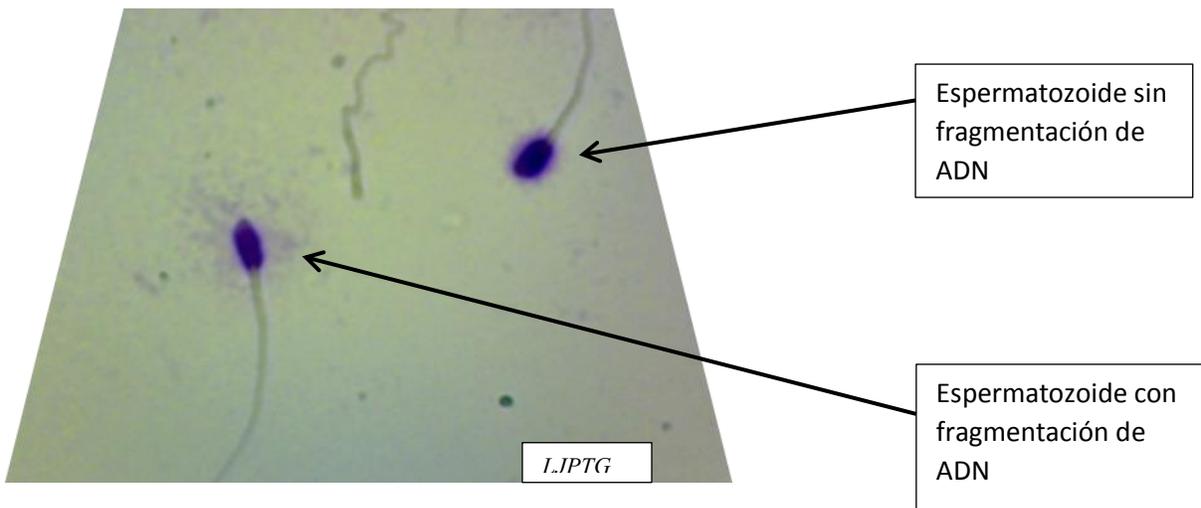


CABALLO N°3

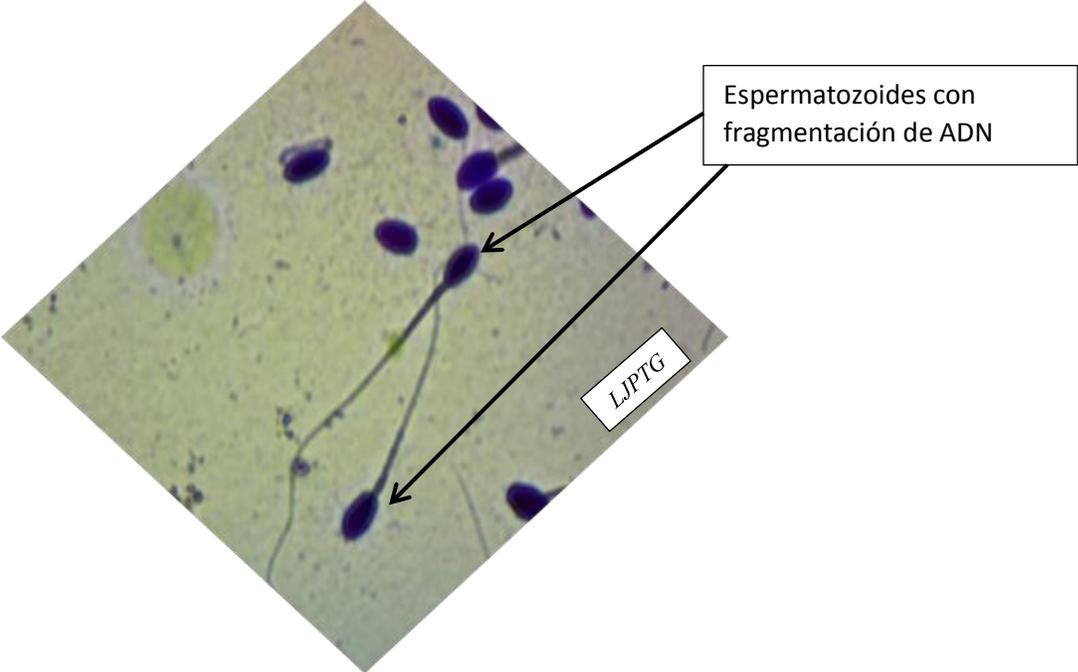


2.- CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT)

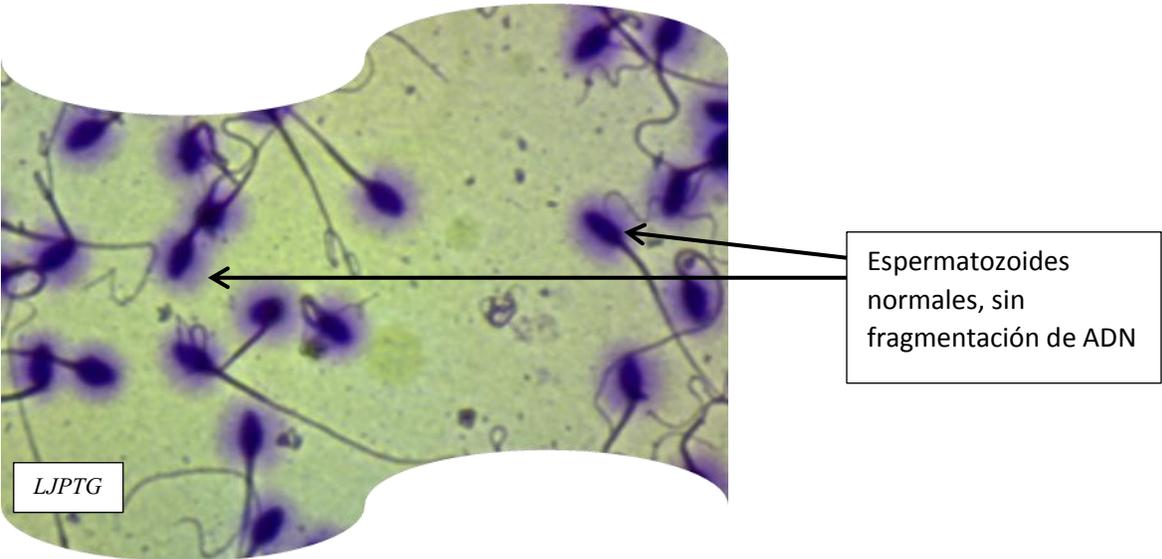
CABALLO N°4



CABALLO Nº5



CABALLO Nº6



XV DISCUSIÓN

Los resultados de la fragmentación de ADN de los seis sementales se acrecentaron conforme pasó el tiempo de refrigeración comportandose como los citados en el trabajo de López-Fernández et al., (2007).

El índice de fragmentación del ADN espermático fue relativamente similar entre los caballos jóvenes del grupo UPM/UAT durante las cuatro montas. Por el contrario los dos caballos viejos demostraron grandes diferencias entre ellos y con respecto a los caballos jóvenes.

Los sementales son frecuentemente utilizados para la reproducción hasta edades avanzadas, siendo la edad avanzada un factor responsable del estrés oxidante en el semen de estos sementales. El caballo C5 de 18 años presentó un índice de fragmentación de 93% en semen fresco. (Promedio en las cuatro montas).

Estudios realizados en ratas demostraron que en los animales viejos, el estrés oxidante aumenta en el semen. La actividad de las enzimas GPX1, GPX4 (glutación peroxidasa 1 y 4) y la superóxido dismutasa (SOD) disminuyen en los espermatozoides. Además la expresión de la GPX4 (glutación peroxidasa 4) disminuye en el núcleo espermático (Weir y Robaire, 2007) y puede estar implicada en la disminución de la condensación de la cromatina, inducida por una disminución del número de los puentes disulfuro, observados en los animales viejos. Esta disminución de la condensación de la cromatina en los animales viejos es responsable del aumento de la sensibilidad del ADN espermático a los daños oxidantes (Zubkova et al., 2005). También un aumento en la producción de las especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides y de la LPO (peroxidación de los lípidos) membranaria se observó en los animales viejos. (Weir y Robaire, 2007). Lo que confirma los resultados en este estudio con el caballo C5 de 18 años.

Los resultados de la prueba de dispersión de la cromatina de los seis caballos tuvieron una correlación negativa con respecto a los resultados de los parámetros convencionales de motilidad y viabilidad. Las diferencias que encontramos en este estudio entre los parámetros anteriormente mencionados se deben a que cada semental se comporta diferente.

Kenny *et al.*, (1995) reportó que los porcentajes de desnaturalización de la cromatina espermática son más altos en sementales subfértiles que en sementales fértiles, 32% versus 16%, y que los registros de la desnaturalización tienen una correlación negativa en el periodo de montas. Los resultados de los caballos C2 de 19 años y el C5 de 18 años presentaron porcentajes más altos de desnaturalización que los otros caballos más jóvenes del grupo. En algunos sementales que presentan un alto nivel de cromatina comprometida en semen fresco, presentan un descenso rápido en el porcentaje de la calidad de la cromatina durante la refrigeración (Love, 2002). El caballo C5 de 18 años presentó en sus muestras de semen fresco un alto porcentaje de desnaturalización que se acrecentó con la refrigeración. La fragmentación del ADN no es estrictamente

dependiente de la temperatura (Love, 2002.); también depende del tiempo de almacenaje, del tipo de diluyente utilizado y sobre todo de la calidad seminal de los sementales. (Love, 2005).

Las especies reactivas de oxígeno se caracterizan por causar daño en el ADN espermático y en el ADN de otras células. Baumber et al., (2003) menciona que en el semen equino el daño al ADN espermático se debe al aumento de las concentraciones de las especies reactivas de oxígeno. En este trabajo se observó lo mismo.

El daño al ADN espermático aparece por ser iniciado cuando el estrés oxidativo afecta previamente a la motilidad del semen.

También aparece un daño al ADN espermático durante el almacenaje del semen equino refrigerado (Linfor y Meyers, 2002) y congelado (Baumber et al., 2003). En nuestro estudio observamos el descenso de la motilidad, de la viabilidad y el aumento de los porcentajes de fragmentación conforme paso el tiempo en que las muestras de semen estuvieron almacenadas en refrigeración.

Un leve estrés oxidativo puede permitir al semen dañado en su ADN fertilizar al ovocito. La célula espermática no tiene la habilidad de reparar el daño del ADN, pero puede fertilizar al ovocito, sin embargo el desarrollo embrionario es reducido y se produce la muerte temprana embrionaria (Ahmadi y Ng, 1999; Morris *et al.*, 2002).

Algunos orígenes potenciales en el estrés oxidante en el semen equino se deben al ejercicio físico excesivo, a la edad, a causas testiculares e infecciones del tracto genital así como al empleo de medicamentos como anabólicos, antibióticos y antiinflamatorios.

Kirschvink et al., (2008) menciona que el ejercicio excesivo al que están expuestos los caballos de carreras en los entrenamientos para prepararlos a las competencias, provoca la aparición del estrés oxidante muscular y sistemático; la contracción de las fibras musculares es el origen de la producción de las especies reactivas de oxígeno. Dos mecanismos parecen estar implicados: el aumento del metabolismo aerobio y la activación de células fagocitarias en respuesta a los daños musculares o a la acción de las hormonas del estrés (la adrenalina, el cortisol entre otras). Estas hormonas son liberadas enseguida del aumento de la demanda metabólica y al aumento de la temperatura central (Peake et al., 2007).

Estos ejercicios físicos intensos podrían igualmente ser el origen del estrés oxidativo en el semen equino, como se demostró en modelos experimentales en ratas expuestas a ejercicio intenso y en aumento, demostraron una disminución en la cantidad de los espermatozoides en su semen y también una disminución de su motilidad. Estas modificaciones se asociaron a un aumento de los marcadores bioquímicos (superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) glutatión reducida (GSH) glutatión peroxidasa (GPX)) del estrés oxidante en los testículos. También la exposición al efecto del estrés oxidante debido a un ejercicio intenso crónico interfiere en la espermatogénesis y en la esteroidogénesis testicular como lo menciona Manna et al., (2004). Un estudio realizado por Taylor et al., 1997, con

cinco sementales, demostró que un ejercicio moderado después de tener a los sementales sin ninguna actividad física puede tener efectos nefastos sobre la calidad del semen. Diferencias constantes en las características morfológicas de los espermatozoides se observaron entre los eyaculados antes y después del ejercicio, esta respuesta al ejercicio fue variable entre los sementales.

XVI CONCLUSIONES

Con este estudio se pudo demostrar que la selección de los sementales para la reproducción depende del manejo y de la calidad de su semen para obtener mejores resultados en la fertilización.

El semen del caballo C1 de 9 años de edad se mantiene viable hasta las 36 h de haber sido conservado en refrigeración. Por lo que su semen puede ser enviado en refrigeración a 34 horas de distancia de su lugar de origen.

El semen de los caballos C4 de 5 años y C6 de 3 años y medio, a pesar de que su semen se mantiene viable hasta las 36 horas de haber sido refrigerado, los resultados de sus parámetros son mejores a las 24 horas de haber sido refrigerado. Por lo que se recomienda utilizar su semen hasta las 24 horas de haber sido refrigerado y puede ser enviado a una distancia de 22 horas de su lugar de origen.

El semen del caballo C3 de 7 años se mantiene viable en refrigeración hasta las 24 horas por lo que su semen puede mandarse hasta 22 horas de distancia de su lugar de origen.

El caballo C2 de 19 años se recomienda sólo para monta directa o inseminación con semen fresco.

El caballo C5 de 18 años de edad por sus resultados en las pruebas efectuadas debe excluirse de la reproducción.

En este estudio se observó que el estrés oxidante es el responsable de la disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Las pruebas convencionales y las pruebas avanzadas a pesar de tener una correlación negativa, deben aplicarse conjuntamente para determinar la calidad seminal de un caballo. Ambas pruebas son de primera elección para evaluar la capacidad fertilizante del esperma de un semental.

Los animales subfértiles deben ser eliminados del hato reproductivo para hacer una selección y poder tener una mejora genética.

Las pruebas convencionales y avanzadas que se utilizaron para realizar este estudio pueden aplicarse en condiciones de campo.

En este estudio se demuestra que estas técnicas son fiables para evaluar la calidad espermática y tener buenos resultados en la reproducción en ausencia de tener un laboratorio equipado

RECOMENDACIONES:

La elección del proceso de conservación al cuál se va a someter el esperma de los sementales dependerá de los resultados que se obtengan del espermiograma, de las pruebas con diferentes diluyentes, utilizando diversas concentraciones, tiempos

de refrigeración sin omitir la evaluación de los factores siguientes: estado físico del animal, edad, medio ambiente, condiciones de vida, alimentación, raza y antecedentes genéticos. Con el fin de adaptar el protocolo de refrigeración a cada individuo y obtener un mayor índice de fertilización.

La presencia de un alto índice de fragmentación de ADN en pruebas con semen fresco, en los eyaculados de cuatro colecciones consecutivas (con un intervalo entre ellas de siete días) y teniendo en cuenta la edad del caballo, y las condiciones de vida, nos indica que puede haber un problema de origen testicular; por lo que debe considerarse hacer pruebas complementarias a las que ya mencionamos anteriormente. Como medir:

- la peroxidación de los lípidos membranares (niveles de MDA, marcador BODIPY 11),
- la oxidación del ADN, (marcador 8-OH-dg),
- la producción de las especies reactivas de oxígeno (quimioluminiscencia, resonancia paramagnética electrónica),
- la actividad de las enzimas antioxidantes,
- la concentración de los antioxidantes no enzimáticos,
- la capacidad antioxidante del plasma seminal (quimioluminiscencia)

Baumber *et al.*, (2003) menciona que el daño al ADN espermático equino se puede bloquear con catalasa o glutatión reducido (GSH), pero no con el superóxido dismutasa, que indica que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el mayor responsable del daño al ADN espermático equino

XVII BIBLIOGRAFÍA

Ahmadi A, Ng SC. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa *Journal of Experimental Zoology* 284 696–704.

Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. 1995. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma, *Human Reproduction*, 10,2061-2071.

Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence, *Journal of cell Physiology*, 151,466-477.

Aitken RJ, De Lullis GN, McLachlan RI. 2009. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of andrology*.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Jennings Z. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 59,1037.

Aitken RJ, Krauss C. 2001. Oxidative stress DNA damage and the Y chromosome, *Reproduction*, 122,497-50.

Aitken RJ, Lambourne S, Gibb Z. 2014. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of sperm physiology oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa; *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 17–27.

Aitken RJ, Smith TB, Lord T, Kuczera L, Koppers AJ, Naumovski N, Connaughton H, Baker MA, De Lullis GN. 2013. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology*;1:192–205.

Aitken RJ, Wingate JK, De Lullis GN, Koopers AJ, McLaughlin EA. 2006. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91, 4154-4163.

Aitken RJ. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function, *Reproduction, Fertility and Development* 7,659-668.

Aitken RJ. 2002. Active oxygen in spermatozoa during epididymal transit. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 435-447.

Alonso A, Pinto M, Gambarotta M, Miragaya M. 2007. Obtención de Preñeces en Equinos por Primoinseminación utilizando Semen Congelado-Descongelado a Dosis. Premio Dirección de Actividades Hípicas 2007 Investigación en Reproducción Equina. <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/4662>

http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/ganaderia/actividades_hipicas/03-informes/
{Consulta 12 en 2016}

Amann RP, Graham JK. 1993. Spermatozoal function, in: Equine Reproduction McKinnon AO, Voss JL (eds) Philadelphia, PA, Lea & Febiger, pp 715-745, with permission from Blackwell Publishing.

Amann RP, Graham JK. 2011. Spermatozoal function. In : Equine reproduction McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. (Eds),. 2nd edition. Wiley-Blackwell : Oxford, 1053-1085.

Amann RP, Pickett BW.1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J.Eq Vet Sci* 7.145-173.

Ameisen JC. 1996. The origin of programmed cell death, *Science*, 272,1278-1279.

Aquila S, Bonofiglio D, Gentile M, Middea E, Gabriele S, Belmonte M, et al. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma is expressed by human spermatozoa: its potential role on the sperm physiology. *J Cell Physiol*; 209:977–86.

Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJG, Sikka S. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism, *Free Radical Biology and Medicine*, 26,869-880.

Aurich C, Spersger J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67, 912–918.

Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa, *Animal Reproduction Science* 89 ; 65–75.

Ball BA, Medina V, Gravance CG and Baumbe J .2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 56, 577-589.

Ball BA, Vo A, Baumer J. 2001^a. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa, *American Journal of Veterinary Research* 62,508-515.

Ball BA. 2003. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa after separation by density-gradient centrifugation or after. *Theriogenology* 60:1.

Ball BA, Vo A. 2002. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C-11-BODIPY581/591 *Journal of Andrology* 23 259–269.

Baronne R. 2001. Chapitre II: Appareil génital mâle. In: Anatomie compare des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnographie II. Vigot, 83-250.

Barrandeguy M, Perkins J, Mac Donough J, Vissani A, Olguin C, Thiry E. 2010a. Occurrence of Equine Coital Exanthema in mares from an embryo transfer center. *Journal of Equine Veterinary Science* Vol 30 N° 3 145-149.

Barrandeguy M, Vissani A, Pont Lezica F, Salamone J, Heguy A, Becerra L, Perglione Olguin C, Thiry E. 2010b. Subclinical infection and periodic shedding of equid herpesvirus 3. *Theriogenology* 74 576-580.

Barrandeguy M. 2010. Pathogenesis of equid herpesvirus 3 infections In: *Virological Aspects and Pathogenesis of Natural and Experimental Equid Herpesvirus 3 Infection in Horses*. PhD Thesis, Chap. 4. 42-68.

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserina and oxidative stress in human spermatozoa, *Human Reproduction*, 15, 1338-1344.

Battellier F, Videment, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology *Anim Reprod Science* 68 :181-190.

Baumber J, Ball BA, Linfor J J, Meyers SA. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 24, 621-628.

Baumer J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. 2000. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and Membrane Lipid Peroxydation, *Journal of Andrology*, 21, 895-902.

Baumer J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. 2003a. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa, *Journal of Andrology*, 24, 621-628.

Baumer J, Ball BA. 2005. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase like activities in equine spermatozoa seminal plasma, and reproductive tissues, *American Journal of Veterinary Journal*, 66, 1415-1419.

Beaulieu V, Da Silva N, Brown CR, Smith PJ, Brown D, Breton S. 2004. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺ATPase (V-ATPase) recycling. *J Biol Chem*.

Blanchard TL et al. 2003. *Manual of equine reproduction*. 2nd edition. Mosby.

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

Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, Durand G, Jardillier JC. 2003. Radicaux libres et anti-oxydants, *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires*, 59-81. Médecine Sciences Flammarion Paris.

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

Broadus CC, Balasuriya UBR, Timoney PJ, White JLR, Makloski C, Torrisi K, Payton M, Holyoak GR. 2011. Infection of embryos following insemination of donor mares with equine arteritis virus infective semen. *Theriogenology* 76 47-60.

Brouwers JF, Boerke A, Silva PF, Garcia-Gil N, Van Gestel RA, Helms JB, Van de Lest CH, Gadella BM. 2011. Mass spectrometric detection of cholesterol oxidation in bovine sperm. *Biol Reprod*; 85:128–36.

Brum AM, Sabeur K, Ball BA. 2008. Apoptotic-Like changes in equine spermatozoa separated by density gradient centrifugation or after cryopreservation, *Theriogenology*, 69,1041-1055.

Burnaugh LM, Sabeur K, Ball BA., 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium, *Theriogenology*, 67, 580-589.

Cadenas E. Davies KJA. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222-230.

Card CE. 1997. Pregnancies from imipramine and Xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *Can Vet J*.38: 171-174.

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

Caudle AB, Fayrerhosken RA. 1989. Stallion fertility evaluation. Part. I. *Equine Practice* 11(2):2630.

- Chan HEZ, Dym M WYC. 2006. Microarray technology offers a novel tool for diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. *Reproduction* 132 :11-9.
- Clire EC, Stephen TM, Bowman P, Leibel T. 1997. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation a disabled stallion. *Can. Vet. J.*; 38: 171-174.
- Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. 1999. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation, *Free Radical Biology and Medicine*, 27,51-59.
- Collins CW, Songsasen N, Monfort SL, Busha M, Wolfe B, James SB, Wildt DE, Pukazhenthii BS. 2006. Seminal traits in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*) following electroejaculation *Animal Reproduction Science* 94 ; 46–49.
- Cook PR, Brazell IA. 1980. "Mapping sequences in loops of nuclear DNA by their progressive detachment from the nuclear cage". *Nucleic Acids Res* 8(13):2895-906.
- Cooper TG, Yeung CH. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 61, 28-38.
- Cooper TG. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 20, 9-11.
- Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Serres-Dalmau C, Gutierrez de las Rozas A, Dávila-Rodríguez M, 2009. Assessment of sperm DNA fragmentation in stallion (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. *Reprod Dom Anim* ; 44 :823-828.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J, 2007. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*; 31(2):120-131.
- Crump J.1989. Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. *Theriogenology* ; 31: 341-346.
- Crump J.1994. Manual semen collection from a Grevy's Zebra stallion (*Equus 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* ; 41:1011-1021.

Dacheux F, Dacheux JL. 2001. L'épididyme et les glandes annexes. In *La reproduction chez les mammifères et l'homme, I*. Editions, ed. (Paris, Editions Ellipses), pp. 290-315.

Dacheux JL, Dacheux F. 2002. Protein secretion in the epididymis. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 151-168.

Dacheux JL, Gatti JL, Castella S, Métayer S, Fouchécourt S, Dacheux F. 2003. The epididymal proteome. In *The third international conference on the epididymis*. Hinton BT, Turner TT.ed. (Charlottesville, The van Daren company).

Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. 2004. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 237, 1-56.

Davis BK. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78:7560-4.

De Lamirande E, Gagnon C. 1992b. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility, *Journal of Andrology*, 13, 379-386.

De Lamirande E, Gagnon C. 1992a. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I Effects on the mobility of intact spermatozoa and on sperm axonemes, *Journal of Andrology*, 13, 368-378.

De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology, *Journal of Reproduction and fertility*, 2, 48-54.

Desvousges AL, Dow C, Hayna JT, Miller L, Joussan d. Hansen PJ, Buhi WC, Troedsson MHT. 2006. Heat shock induces apoptosis in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 94; 125-126.

Díaz H, Arancibia C. 1971. *Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos*. Edit. Vera y Giannini, Santiago, Chile.

Díaz H, Díaz A. 1989. *Sexualidad y control reproductivo en equino*. Edit. Ograma S.A., Santiago, Chile.

Domínguez-Fandos D, Camejo M, Ballescá J, Oliva R. 2007. Human sperm DNA fragmentation: Correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry*; 71^a 1011- 1018.

- Dowsett KF. 1988. Reproductive evaluation of the stallion. *Equine Practice*. 10(2): 1824.
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* 5:1213-1219.
- Edwards JF. 2008. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. *Animal reproduction science* 107, 197-207.
- Favier A. 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur, *Annales de Biologie Clinique*, 55, 9-16.
- Favier A. 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité Chimique*, 269-270, 108-115.
- Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 62, 1790-1803.
- Gebauer MP, Pickett BW, Swiertra EE. 1974. Reproductive physiology of the stallion; 11. Daily production and output of sperm. *J Anim. Sci.* 39 (4): 732736.
- Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 1992. 2nd ed. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices 642.
- Go YY, Bailey E, Cook DG, Coleman SJ, MacLeod JN, Chen K, Timoney PJ, Balasuriya UBR. 2011. Genome-wide association study among four horse breeds identifies a common haplotype associated with In Vitro CD3+ T Cell susceptibility/resistance to equine arteritis virus infection. *Journal of Virology* Vol. 85 Num 24 13174-13184.
- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili E. 1997. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 57, 1502-1508.
- González-Urdiales R, Tejerina F, Dominguez JC, Alegre B, Ferreras A, Pelaéz J, Bernal S, Cárdenas S. 2006. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática In: Bonets. Martínez E.A., Rodríguez-Gil J.E., Barrera X eds. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcinos*. Universitat di Girona. Red Temática Nacional de Reproducción Porcina Girona Spain.

Graham J, Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/ thawed semen. *Theriogenology*; 64:492-504.

Guerin JF, Mathieu C, Lornage J, Pinatel MC, Bouliou D. 1989. Improvement of survival and fertilizing capacity of human spermatozoa in an IVF programme by selection on discontinuous Percoll gradients, *Human Reproduction*, 4, 798-804.

Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda ML, Uribe Carvajal S, Trujillo Ortega ME. 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58; 287–292.

Hafez E.S.E., 1984. Reproducción e inseminación artificial en animales. 4º Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A.de C.V. 9, 160-162

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, 1-543.

Hamilton-Thorn research. Danvers. MA USA

<http://www.equitainer.com/equine/equitainer/index.htm> {Consulta 16 nov 2015}

Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinnenberg HR, Schill WB, Kruger TF. 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non leukocytospermic patients, *Fertility and Sterility*, 83, 635-642.

Hermo L, Robaire B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In *The epididymis: from molecules to clinical practice*, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers), pp. 81-102.

Hess RA, Bunick D, Bahr J. 2001. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol* 178, 29-38.

Heymon Y, Vignon X. 2005. *Reproduction des animaux d'élevage*. Educagri.

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

Hoffer AP, Hinton BT. 1984. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod* 30, 991-1004.

Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241–1252.

Jin YZ, El Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biology and Therapy*, 4, 139-163.

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

Johnston, DS, Jelinsky SA, Bang HJ, Dicandoloro P, Wilson E, Kopf GS, Turner T T. 2005. The Murine Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis. *Biol Reprod*.

Jones R, Mann T, Sherins R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma, *Fertility and Sterility*, 31, 531-537.

Jordan A. 1988. Estimación de la fertilidad potencial en potros fina sangre de carrera mediante pruebas espermáticas de laboratorio. Tesis. Fac. De Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Santiago Chile.

Jussiaux M., Trillaud C. ; La reproduction chez le cheval, l'étalon ; Ed André Lesson ; 1977.

Kamada M, Oda T, Wada R, Fukunaga Y.1984. Isolation of *Klebsiella pneumoniae*, Capsule Type1, from mares with metritis and infertility in Japan. *Bull Equine Res Inst*. 21,95-99.

Kenney R.M, Evenson DP, Garcia MC, Love CC.1995. Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 647-653.

Kenney RM, Cummings MR, Zierdt CH, Uphenour N.1992. *Pseudomonas aeruginosa* Typing of genital tract isolates and conolization of the stallion penis: significance, diagnosis, and treatment. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* pp 601-608.

Kirschvink N. de Moffarts B, Lekeux P. 2008. The oxidant/antioxydant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177,178-191.

Knobil E, Neill JD. 1999. Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Volume 4 Pro-Z; 586-596.

Koopers AJ, De Lullis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*,93, 3199-3207.

Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. 2010. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* ; 48:112–9.

Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. 2011. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* ; 436:687–98.

Kosniak K. 1975. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen in stallions. *J. Reprod. Fertil.* 23 (Suppl.), 59–61.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. 2010. Free radicals : Their beneficial and detrimental effects on sperm function, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48,425-435.

Lewis B, Aitken RJ. 2001. A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa, *Journal of Andrology* 22,611-622.

Li Y, Trush MA. 1998. Diphenyleneiodonium, an NADPH oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:295–9.

Lindeberg H, Karjalainen E, Koskinen E, Katila T. 1999. Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame®) versus a Missouri® artificial vagina. *Theriogenology*; 51:1157-1173.

Lindeberg H, Koskinen E, Huhtinen M, Reilas T, Pertulla H, Katila T. 2002, Influence of PG administration and follicle status on the number of conceptuses. *Theriogenology*, 58: 571-574.

Linfor JJ, Meyers SA. 2002. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. *J Androl* 23, 107-113.

Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* 105, 119–128.

López S, Jurisicova A, Sun J-G, Casper RF. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa, *Human Reproduction*, 13,896-900.

López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. II. The stallion. *Theriogenology*, in press.

López-Fernández C, Gosálvez J, Mezzanotte R. 1989. Heterochromatin heterogeneity in *Oedipoda germanica* (Orthoptera) detected by in situ digestion with restriction endonucleases. *Heredity*, 62: 269-277.

Lord T, Nixon B, Jones KT, Aitken RJ. 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biol Reprod*; 88:67.

Love CC, Kenny RM. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, 50,955-972.

Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*; 57:1135-42.

Love CC. 2005. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. Volume 89, Issues 1-4, October 2005, pages 39-45.

Manna I, Janna K, Samanta PK. 2004. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42, 816-822.

Marnett LJ. 2000. Oxydoradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21, 361-370.

Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R, Nistal M. 1995. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27, 195-206.

Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga PP. 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 26, 145-148.

Mc Donnell SM, Love CC. 1991a. Manual stimulation collection of semen from stallion: Training time, semen quality, and sexual behavior. *Theriogenology*; 33: 1201-1205.

Mc Donnell SM, Love CC. 1991b. Xylacine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*; 36: 73-76.

Mc Donnell SM, Odian MJ. 1994. Imipramina and Xilacine-induced ex copula ejaculation in stallion. *Theriogenology*; 41: 1005-1010.

Mc Donnell SM, Pozor, MA, Beech J, Sweeney R.W.1991. Use of manual stimulation for collection of semen from an atactic stallion unable to mount. J.A.V. M.A. 1991; 199: 753-754.

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

Morillo Rodríguez A, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. Biol Reprod ; 81:1106–11.

Morrell JM, Geraghty RM. 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. Equine Veterinary Journal 38 (3) 224-229.

Morrell JM, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A. 2013. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. Anim Reprod Sci ; 140:62–9.

Morresey PR. 2011. Dourine In: Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult. Clinical Companion. Equine Theriogenology. Carleton CL. Ed. Wiley-Blackwell. 670-674.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum. Reprod. 17, 990–998.

Neild D.N. Gadella B.M, Agüero A, Stout T.A.E, Colenbrander B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm Department of Theriogenology, School of Veterinary Sciences, Animal Reproduction Science 89, 47–56.

ODOUE. Diario Oficial de la Unión Europea 31.8.2010 L 228/52
DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 26 de agosto de 2010 sobre la importación en la Unión de esperma, óvulos y embriones de animales de la especie equina en lo que se refiere a las listas de centros de recogida y almacenamiento de esperma y de equipos de recogida y producción de embriones y a los requisitos de certificación [notificada con el número C(2010) 5781] (Texto pertinente a efectos del EEE) (2010/471/UE)

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32010D0471>
{Consulta 17jul 2016}

Olive P, Banáth J. 2006. The comet assay : A method to measure DNA damage in individuals cells. Nature protocols ; 1(1) : 23-29.

Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK. 2003. Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc Res Tech* 61,46-55.

Organización Internacional para las epizootias, dependiente de Naciones Unidas, para el transporte internacional de equinos (OIE, 2001).

Ortega y Ferrusola C, Fernandez LG, Morrell JM, Sandoval CS, Garcia BM, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Pena FJ. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes, *Reproduction*, 138, 55-63.

Palmer E. 1993. Induction of ovulation. In: *Equine reproduction*. 4th ed. Philadelphia: Mc Kinnon and Voss, Lea et Febiger, 344-347.

Peake JM, Suzuki K, Coombes JS. 2007. The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18,357-371.

Pelletier RM, Byers SW. 1992. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20, 3-33.

Peña FJ, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Macías García B. 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review *Reprod Domestic Anim* 44:345-349.

Pickett B.W. 1993. Reproductive evaluation of the stallion. In :*Equine reproduction* McKinnon A.O., Voss J.L. (Eds), Williams & Wilkins : Philadelphia, 755-768.

Plante M, De Lamirande E, Gagnon C. 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility, *Fertility and Sterility*, 62, 387-393.

Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F, Janny L, Grizard G. 2009. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine, *Gynécologie, Obstétrique et Fertilité*.

Ponthier J, Van den Berghe F, Parrilla-Hernandez S, Hanzen C, Deleuze S. 2014. Congelation du sperme dans l'espèce équine : état des lieux et perspectives. *Ann. Méd. Vét.*, 158, 0517-722.

Price S, Aurich J, Davies-Morel M, Aurich C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 °C and 15 °C. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 261–266.

Pujianto DA, Curry BJ, Aitken RJ. 2010. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology* ; 151:1269–79.

Quijano G. 2011. Aspectos regulatorios, vinculados a la operación de un CEPROSEM para equinos.

http://conasamexico.org.mx/conasa/2011_docs_19a_reunion/201110_26-miercoles/salon_LAS-NUBES/CABALLOS/comite_8/GABRIELA_QUIJANO.pdf
{Consulta 05 JUL 2016}

Raphael CF, Andrade AFC, Nascimento J, Arruda RP. 2008. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa *Animal Reproduction Science* 107, 344–345.

Restrepo Betancur G, Úsuga Suárez A, Rojano BA. 2013. Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Revista Universidad CES Colombia Medicina Veterinaria y Zootecnia / Volumen 8 / Número 1 / enero – junio de 2013.*

Robaire B, Viger RS. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52, 226-236.

Rodriguez PC, Valdez LB, Zaoborny JT. et al. 2011. Nitric oxide and superoxide anion production during heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 46(1):74-81).

Rowley DD, Lock TF, Shipley CF. 1999. Fertility of Detomidine HCl-induced ex copula- ejaculated stallion semen after storage at 5°C. *AAEP Proceedings*. 45: 221-223.

Sabeur K, Ball BA. 2006. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa, *American Journal of Veterinary Research*, 67,701-706.

Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility : from research bench to clinical practice, *Journal of Andrology*, 23,737-752.

Samper JC. 2009. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed. p. 51.

Scarlett CJ, Lin M, Aitken J. 2001. Actin polymerisation during morphogenesis of the acrosome as spermatozoa undergo epididymal maturation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J Anat* 198, 93-101.

SENASA resolución 494/2011 de fecha 28/07/2011 se refiere a la importación, comercialización y utilización de la Vacuna Inactivada contra Arteritis viral Equina: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1501&ino=1501&io=17615> {Consulta 17jul2016}

Senger PL. 2005. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions : Pullman, 373 p.

Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, Molecular Cell, 9,459-470.

Sipila P, Cooper TG, Yeung CH, Mustonen M, Penttinen J, Drevet J, Huhtaniemi I, Poutanen M. 2002. Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. Mol Endocrinol 16, 2603-2617.

Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Godecke S, Birchmeier C. 1996. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. Genes Dev 10, 1184-1193.

Stover J, Seager SWJ, Dolensk EP, Doherty J, Wildt DF, Platz CC. 1981. Electroejaculation and semen evaluation of Przewalski horse (*Equus przewalski*). Am Assoc Zoo Vet; 144-145.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*, Biology of Reproduction, 56,602-607.

Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. Biol Reprod 55, 956-974.

Taylor M.J., Evans J.W., Householder D.D., Potter G.D., Varner D.D., 1997. Reproductive parameters of breeding stallions in response to a moderate physical conditioning program In Proceeding of the 15th Equine Nutrition and Physiology Symposium, 104-108

Thibault C. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses.

Tibary A. 2005. Pathologie Génitale. In: Reproduction Équine. Tome II: L'Étalon (2005) Tibary A, Bakkoury M. Ed. Actes Éditions. Chap. 4. 185-316.

- Tosic J, Walton A. 1950. Metabolism of spermatozoa. The formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. *Biochem J*;47:199–212.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G, Panfili E. 1998. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 59, 753-758.
- Tremellen K. 2008. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective, *Human Reproduction Update*, 14,243-258.
- Turner R.M. 2005. Current techniques for evaluation of stallion fertility original research article. *Clinical Techniques in Equine Practise* ; 4(3) : 257-268.
- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken R.J. 1998. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa : lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*, 13, 1429-1436.
- Varner DD, Blanchard TL , Spbrinsko, Love CC , Taylor TS, Johnson L. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions animal reproduction science 60-61;493-509.
- Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, Meyers SA. 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24h at 5 or 20°C. *Theriogenology* 32, 515–525.
- Varner DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* ; 70(3) : 448-462.
- Vignini A, Buldreghini E, Nanetti L, Amoroso S, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G, Mazzanti L, Balercia G. 2009. Free thiols in human spermatozoa: are Nap/Kp-ATPase, Ca²⁺-ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation. *Reprod Biomed Online*;18:132–40.
- Voss JL, Pickett BW, Squires EL. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 178:287289.
- Voss JL. 1993. P' Human Chorionic Gonadotropin. In: *Equine reproduction*. 4th ed. Philadelphia: Mc Kinnon and Voss, Lea et Febiger, 325-328.
- Weir CP, Robaire B. 2007. Spermatozoa Have Decreased Antioxidant Enzymatic Capacity and Increased Reactive Oxygen Species Production During Aging in the Brown Norway Rat. *Journal of Andrology*, Vol. 28, No. 2, March/April 2007.

Wnuka M, Lewinska A, Oklejewicz B, Bartosz G, Tischner M, Bugno-Poniewierska M. 2010. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells Theriogenology* 74 , 1677–1684.

Yates DJ, Whitacre MD. 1988. Equine artificial insemination. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 4 4(2): 291-304.

Yates DJ, Whitacre MD. 1993. Inseminación artificial en el equino. In: *Veterinary Clinics of North America. (Equine practice)*. By: W. B. Saunders Company. Eds. Intermedica. Philadelphia: vol 4; nº 2, 173-192.

Yeung CH, Anapolski M, Sipila P, Wagenfeld A, Poutanen M, Huhtaniemi I, Nieschlag E, Cooper TG. 2002. Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation. *Biol Reprod* 67, 269-275.

Yeung, C. H., Schroter, S., Kirchoff, C., and Cooper, T. G. 2000. Maturational changes of the CD52-like epididymal glycoprotein on cynomolgus monkey sperm and their apparent reversal in capacitation conditions. *Mol Reprod Dev* 57, 280-289.

Zhou CX, Zhang YL, Xiao L, Zheng M, Leung KM, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY, Ho LS. et al. 2004. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nat Cell Biol* 6, 458-464.

Zubkova EV, Wade M, Robaire B. 2005. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil Steril*.84 Suppl 2:1191–1198.

XVIII ANEXO

A) DATOS DE LOS CABALLOS DEL GRUPO UPM/UAT

1.- CABALLO N°1

Edad 9 años raza Azteca
Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
72ml	7.4	226millones/ml	32%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 32%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Pieza media: doblados, hinchados.

Gotas citoplasmáticas: distales y proximales.

Cola: en forma de gancho, en espiral.

2.- CABALLO N°2

Edad 19 años raza Azteca
Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
58ml	7.3	172millones/ml	24%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 24%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Pieza media: doblados, hinchados.

Gotas citoplasmáticas: distales y proximales.

Cola: en forma de gancho, en espiral.

3.- CABALLO N°3

Edad 7 años raza Azteca
Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
101ml	7	183millones/ml	27%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 27%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Pieza media: doblados, hinchados.

Gotas citoplasmáticas: distales y proximales.

Cola: en forma de gancho, en espiral.

4.- CABALLO Nº4

Edad 5 años raza Cuarto de Milla

Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
35ml	7.1	194millones/ml	16%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 16%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Pieza media: hinchadas.

Gotas citoplasmáticas: distales y proximales.

Cola: doblada.

5.- CABALLO Nº5

Edad 18 años raza Cuarto de Milla

Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
53ml	7	167millones/ml	28%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 28%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Pieza media: hinchadas.

Gotas citoplasmáticas: distales.

Cola: doblada.

6.- CABALLO N°6

Edad 3 años y medio raza Cuarto de Milla

Promedio de las cuatro montas

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
50ml	7.2	297millones/ml	11%

MORFOLOGÍA

En este semental se encontraron las siguientes anomalías con un promedio de las cuatro montas de 11%:

Cabezas: desprendidas, dobles.

Gotas citoplasmáticas: distales.

Cola: doblada.

7.- PROMEDIO DE LOS TRES CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD DE MÉXICO (UPM)

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
77ml	7.2	194millones/ml	28%

8.- PROMEDIO DE LOS TRES CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT)

VOLUMEN	pH	CONCENTRACIÓN	ANORMALIDADES
77ml	7.3	194millones/ml	18%

9.- MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL GRUPO DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD DE MÉXICO/FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UPM/UAT)

- MOTILIDAD EN TIEMPO DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD EN TIEMPO					
CABALLO	T0	T12	T24	T36	P
	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	95+-0	75.67+-14.64	62.67+-13.65	49.34+-17.78	0.01
C2	66+-0	21+-8.54	11+-4	5.33+-2.52	0
C3	76+-0	70.33+-7.50	52.33+-11.02	33.33+-8.02	0
C4	94+-0	80.33+-1.15	73.33+-6.43	54+-7.55	0

C5	36+-0	21+-1.73	11+-4.36	7.67+-2.52	0
C6	94+-0	76-67+-3.21	66+-4.36	52.33+-3.78	0
C1,2,3	79+-0	55.67+-4.51	34.33+-2.08	29.67+-7.77	0
C5,6,7	75+-0	59.33+-0.58	46.33+-10.78	38+-4.58	0
C1,2,3,4,5,6	76.83+-21.85	57.50+-27.50	46.05+-27.17	33.67+-22.21	0
C1,3,4,6					
C5,2					

M.- Media DST.- Desviación estándar

-MOTILIDAD POR DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

MOTILIDAD POR DILUCIÓN				
	D1	D2	D3	P
CABALLO	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	58.25+-27.43	72.75+-18	81+-13.56	0.33
C2	29.75+-25.85	25.50+-27.69	22.25+-29.45	0.93
C3	51.25+-22.70	58.25+-18.90	64.50+-17.02	0.65
C4	71.75+-20.63	76.50+-16.22	78+-13.50	0.86
C5	18+-14.35	18.25+-13.02	20.50+-11.12	0.96
C6	69+-19.54	73.75+-16.74	74+-16.55	0.9
C1,2,3	46.50+-24.90	49.75+-22.54	52.75+-20.84	0.93
C4,5,6	50.25+-20.42	56.25+-15.17	57.50+-13.67	0.8
C1,2,3,4,5,6	49.67+-28.13	54.17+-29.42	56.70+-30.48	0.7
C1,3,4,6	62.56+-22.08	70.31+-17.27	74.37+-15.07	0.19
C5,2	23.87+-20.35	21.87+-20.41	21.37+-20.63	0.97

M.- Media DST.- Desviación estándar

-VIABILIDAD EN TIEMPO DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD EN TIEMPO					
	T0	T12	T24	T36	P
CABALLO	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	85+-0	67.67+-16.62	57.33+-13.28	45.67+-16.26	0.01
C2	66+-0	30+-10.53	19+-7	11.67+-3.51	0
C3	77+-0	72.33+-7.64	51.67+-14.04	36.67+-8.50	0.001
C4	84+-0	71.67+-1.53	65.33+-5.68	46+-5.30	0
C5	43+-0	24.33+-2.30	15+-1.73	10.33+-1.15	0
C6	84+-0	68+-3.46	58+-6.93	46.33+-4.82	0
C1,2,3	76+-0	56.33+-4.73	42.67+-6.66	31.67+-7.09	0
C4,5,6,	70+-0	54.66+-0.58	46.67+-5.13	34.67+-4.16	0
C1,2,3,4,5,6	73.17+-15.44	55.72+-22.06	44.61+-21.50	33.28+-17.66	0
C1,3,4,6	82.50+-3.34	69.92+-8.26	58.08+-10.40	43.60+-9.39	0
C5,2	54.50+-12.60	27.33+-7.40	17.67+-5.16	11.67+-2.94	0

M.- Media DST.- Desviación estándar

-VIABILIDAD POR DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

VIABILIDAD POR DILUCIÓN				
	D1	D2	D3	P
CABALLO	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	51.25+-24.27	67.25+-14.84	73.25+-12.61	0.25
C2	36.75+-22.02	32+-23.99	26.25+-26.89	0.83
C3	51.50+-22.87	60.25+-18.82	66.50+-15.61	0.56
C4	63.75+-18.84	68+-15.07	68.50+-13.99	0.9
C5	23+-15.40	23.25+-14.05	23.25+-14.05	0.99
C6	59.75+-18.73	66+-15.05	66.50+-14.27	0.81
C1,2,3	46.50+-22.57	53.25+-18.28	55.25+-16.52	0.8
C4,5,6,	48.75+-17.23	52.25+-14.20	53.50+-13.18	0.89
C1,2,3,4,5,6	47.67+-23-07	57.80+-24.05	54.62+-25.45	0.54
C1,3,4,6	56.56+-19.85	65.37+-14.68	68.69+-12.98	0.10
C5,2	29.87+-19.07	27.62+-18.79	25.87+-19.34	0.92

M.- Media **DST.-** Desviación estándar

- REACCIÓN ACROSOMAL EN TIEMPO DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL EN TIEMPO					
CABALLO	T0	T12	T24	T36	P
	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	43+-0	52+-2	64.34+-1.53	76.67+-1.53	0
C2	58+-0	71+-3	79+-1	80.67+-1.58	0
C3	53+-0	72.67+-2.52	73.33+-2.08	78.33+-4.51	0
C4	16+-0	27.67+-2.08	28.67+-1.15	40.67+-2.08	0
C5	21+-0	34.33+-4.16	40.33+-3.78	47+-3.46	0
C6	15+-0	23.33+-1.15	27+-1.73	42.62+-4.04	0
C1,2,3	51+-0	65.33+-0.58	72+-1	78.67+-1.53	0
C4,5,6	17+-0	28.33+-1.53	32+-2	43.33+-1.53	0
C1,2,3,4,5,6	34.33+-18.17	46.83+-20.50	52.11+-21.66	61+-18.40	0.001
C1,3,4,6	31.75+-17.37	43.92+-20.82	48.33+-21.72	59.58+-18.95	0.01
C5,2	39.50+-20.26	52.67+-20.34	59.67+-21.32	63.83+-18.60	0.20

M.- Media **DST.-** Desviación estándar

- REACCIÓN ACROSOMAL POR DILUCIÓN DEL GRUPO UPM/UAT

REACCIÓN ACROSOMAL POR DILUCIÓN				
	D1	D2	D3	P
CABALLO	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
C1	60.25+-15.11	59+-14.76	57.75+-14.17	0.97
C2	70.75+-9.84	72.25+-10.44	73.50+-10.88	0.93
C3	71.5+-12.9	69.5+-11.21	67+-9.49	0.85

C4	28.75+-11.17	27.75+-9.81	28.25+-9.46	0.99
C5	36+-12.49	36.25+-12.13	34.75+-9.60	0.98
C6	26,5+-9.60	27.5+-12.60	27+-12.83	0.99
C1,2,3	67.50+-12.40	66.75+-11.95	66+-11.13	0.98
C4,5,6,	30.10+-30.25	30.50+-11.56	29.75+-10.21	0.99
C1,2,3,4,5,6	48.96+-22.22	48.71+-21.98	48.04+-21.59	0.98
C1,3,4,6	46.75+-23.02	45.94+-22.18	45+-21.04	0.97
C5,2	53.37+-21.30	54.25+-21.90	54.13+-22.79	0.99

M.- Media **DST.-** Desviación estándar

10.- MEDIAS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS SEIS CABALLOS DEL GRUPO DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD DE MÉXICO/FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UPM/UAT)

CABALLO	C1	C3	C4	C6	C2	C5	P
	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	M+-DST	
MOTILIDAD	70.67+20.98	58+-18.67	75.42+15.66	72.25+16.16	25.83+25.26	18.92+11.73	0
VIABILIDAD	63.92+18.92	59.42+18.63	67.17+14.28	64.08+14.94	31.67+22.50	23.92+12.68	0
RACROS*	59+-13.33	69.33+10.38	28.25+-9.21	27+-10.66	72.17+-9.47	35.67+10.39	0

M.- Media **DST.-** Desviación estándar ***RACROS.-** Reacción acrosomal

ABREVIACIONES UTILIZADAS:

D.- dilución ***DILUCIÓN.-** parte de semen por partes de diluyente

UPM.- Policía Montada de la Cd de México

UAT.- Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

TO.- Hora cero (INICIO) **T12.-** A las 12 horas* **T24.-** A las 24 horas* **T36.-** A las 36 horas*. (* de haber sido colectado) **T.-** tiempo **M.-** Monta **C.-** Caballo

D1.- 1:1* **C1.-** Edad 9 años **C4.-** Edad 5 años **RACROS.-** Reacción acrosomal

D2.- 1:2* **C2.-** Edad 19 años **C5.-** Edad 18 años **SC.-** Suma de cuadrados

D3.- 1:3* **C3.-** Edad 7 años **C6.-** Edad 3 años y medio **GL.-** Grados de libertad

M.- Media **DST.-** Desviación estándar **Signif.-** Significancia **P.-** valor de P

F.- Ratio **R.-** Error residual

B) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE SUPERVIVENCIA CON EL MÉTODO DE KAPLAN MEIER

(Log Rank) Significancia P=0.05

UPM.- Policía Montada de la Cd. de México

UAT.-Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas

1.-CABALLOS DE LA POLICÍA MONTADA DE LA CD. DE MÉXICO (UPM)

MONTA N°1 UPM

CABALLO N°1: 9 años, CABALLO N°2: 19 años, CABALLO N°3: 7 años.

Comparaciones globales. Monta n°1. Caballos de la UPM.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1414.860	2	.000

Comparaciones por parejas. Monta n°1. Caballos de la UPM.

		1		2		3	
		Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
	Factor (#Caballo)						
Log Rank	1			17.814	.000	951.263	.000
(Mantel-Cox)	2	17.814	.000			749.520	.000
	3	951.263	.000	749.520	.000		

MONTA N°2 UPM

CABALLO N°1: 9 años, CABALLO N°2: 19 años, CABALLO N°3: 7 años.

Comparaciones globales. Monta n°2.Caballos UPM.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	151.777	2	.000

Comparaciones por parejas. Monta n°2. Caballos UPM.

		1		2		3	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			96.741	.000	.237	.626
	2	96.741	.000			106.143	.000
	3	.237	.626	106.143	.000		

MONTA N°3 UPM

CABALLO N°1: 9 años, CABALLO N°2: 19 años, CABALLO N°3: 7 años.

Comparaciones globales. Monta n°3. Caballos UPM.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	104.386	2	.000

Comparaciones por parejas. Monta n°3. Caballos UPM.

		1		2		3	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			70.004	.000	.037	.847
	2	70.004	.000			73.248	.000
	3	.037	.847	73.248	.000		

MONTA N°4 UPM

CABALLO N°1: 9 años, CABALLO N°2: 19 años, CABALLO N°3: 7 años.

Comparaciones globales. Monta n°4. Caballos UPM.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	142.540	2	.000

Comparaciones por parejas. Monta n°4. Caballos UPM.

		1		2		3	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			78.532	.000	3.381	.066
	2	78.532	.000			113.150	.000

3	3.381	.066	113.150	.000
---	-------	------	---------	------

2.- CABALLOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS (UAT)

MONTA N°1 UAT

CABALLO N°1: 5 años, **CABALLO N°2:** 18 años, **CABALLO N°3:** 3años.

Comparaciones globales. Montaña n°1. Caballos UAT.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5324.381	2	.000

Comparaciones por parejas. Montaña n°1. Caballos UAT.

		1		2		3	
		Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			2840.463	.000	10.523	.001
	2	2840.463	.000			3050.940	.000
	3	10.523	.001	3050.940	.000		

MONTA N°2 UAT

CABALLO N°1: 5 años, **CABALLO N°2:** 18 años, **CABALLO N°3:** 3años.

Comparaciones globales. Montaña n°2. Caballos UAT.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4883.549	2	.000

Comparaciones por parejas. Montaña n°2. Caballos UAT.

		1		2		3	
		Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			2624.029	.000	7.928	.005
	2	2624.029	.000			2799.833	.000
	3	7.928	.005	2799.833	.000		

MONTA Nº3 UAT

CABALLO Nº1: 5 años, **CABALLO Nº2:** 18 años, **CABALLO Nº3:** 3años.

Comparaciones globales. Montañ n°3. Caballos UAT.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5039.465	2	.000

Comparaciones por parejas. Montañ n°3. Caballos UAT.

		1		2		3		
		Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1				2748.125	.000	2.130	.144
	2		2748.125	.000			2836.445	.000
	3		2.130	.144	2836.445	.000		

MONTA Nº4 UAT

CABALLO Nº1: 5 años, **CABALLO Nº2:** 18 años, **CABALLO Nº3:** 3años.

Comparaciones globales. Montañ n°4. Caballos UAT.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5169.654	2	.000

Comparaciones por parejas. Montañ n°4. Caballos UAT.

		1		2		3		
		Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1				2779.926	.000	7.646	.006
	2		2779.926	.000			2955.805	.000
	3		7.646	.006	2955.805	.000		

3.- COMPARACIÓN ENTRE LOS CABALLOS DE LA UPM Y LOS CABALLOS DE LA UAT

NOTA:

El caballo n°1 representa el promedio de los caballos de la UPM.

El caballo n°2 representa el promedio de los caballos de la UAT.

MONTA N°1 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).

Comparaciones globales entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).Monta n°1.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	161.466	1	.000

Comparaciones por parejas entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°1.

		1		2	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			161.466	.000
	2	161.466	.000		

MONTA N°2 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde)

Comparaciones globales entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°2.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	123.482	1	.000

Comparaciones por parejas entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°2.

		1		2	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			123.482	.000
	2	123.482	.000		

MONTA N°3 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).

Comparaciones globales entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).
Monta n°3.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	133.365	1	.000

Comparaciones por parejas entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°3.

		1		2	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			133.365	.000
	2	133.365	.000		

MONTA N°4 UPM/UAT

Comparación entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde).

Comparaciones globales entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°4.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	155.912	1	.000

Comparaciones por parejas entre los caballos de la UPM (caballo n°1, azul) y los de la UAT (caballo n°2, verde). Monta n°4.

		1		2	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1			155.912	.000
	2	155.912	.000		

4.- CABALLOS JÓVENES DEL GRUPO UPM/UAT

MONTA N°1. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, CABALLO N°3: 7 años, CABALLO N°4: 5 años.

CABALLO N°6: 3 años

Comparaciones globales. Caballos jóvenes del grupo experimental UPM/UAT. Monta n°1.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2154.501	3	.000

Comparaciones por parejas. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°1.

		1		3		4		6	
Factor		Chi-	Sig.	Chi-	Sig.	Chi-	Sig.	Chi-	Sig.
(#Caballo)		cuadrado		cuadrado		cuadrado		cuadrado	
Log Rank (Mantel-Cox)	1			951.263	.000	1.725	.189	5.862	.015
	3	951.263	.000			887.980	.000	1068.258	.000
	4	1.725	.189	887.980	.000			13.899	.000
	6	5.862	.015	1068.258	.000	13.899	.000		

MONTA N°2. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, CABALLO N°3: 7 años, CABALLO N°4: 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.

Comparaciones globales. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	14.369	3	.002

Comparaciones por parejas. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

		1		3		4		6	
Factor		Chi-	Sig.	Chi-	Sig.	Chi-	Sig.	Chi-	Sig.
(#Caballo)		cuadrado		cuadrado		cuadrado		cuadrado	
Log Rank	1			.237	.626	7.934	.005	.000	1.000

(Mantel-Cox)	3	.237	.626			10.904	.001	.237	.626
	4	7.934	.005	10.904	.001			7.928	.005
	6	.000	1.000	.237	.626	7.928	.005		

MONTA N°3. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, **CABALLO N°3:** 7 años, **CABALLO N°4:** 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.

Comparaciones globales. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7.630	3	.054

Comparaciones por parejas. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

		1		3		4		6	
Factor		Chi-		Chi-		Chi-		Chi-	
(#Caballo)		cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.
Log Rank	1			.005	.942	.846	.358	5.647	.017
(Mantel-Cox)	3	.005	.942			.987	.320	6.008	.014
	4	.846	.358	.987	.320			2.130	.144
	6	5.647	.017	6.008	.014	2.130	.144		

MONTA N°4. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 8 años, **CABALLO N°3:** 7 años, **CABALLO N°4:** 5 años,

CABALLO N°6: 3 años.

Comparaciones globales. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	13.589	3	.004

Comparaciones por parejas. Caballos jóvenes del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

		1		3		4		6	
Factor		Chi-		Chi-		Chi-		Chi-	
(#Caballo)		cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.	cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-	1			3.381	.066	.180	.671	7.640	.006

Cox)	3	3.381	.066			5.120	.024	.862	.353
	4	.180	.671	5.120	.024			10.157	.001
	6	7.640	.006	.862	.353	10.157	.001		

5.- CABALLOS VIEJOS DEL GRUPO UPM/UAT

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).

MONTA N°1. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).

Comparaciones globales. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°1.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2640.450	1	.000

Comparaciones por parejas. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°1.

		2		5	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2			2640.450	.000
	5	2640.450	.000		

MONTA N°2. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT)

Comparaciones globales. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2142.117	1	.000

Comparaciones por parejas. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°2.

		2		5	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2			2142.117	.000
	5	2142.117	.000		

MONTA N°3. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT).

Comparaciones globales. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2104.652	1	.000

Comparaciones por parejas. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°3.

		2		5	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2			2104.652	.000
	5	2104.652	.000		

MONTA N°4. Caballos viejos del grupo UPM/UAT.

CABALLOS VIEJOS: N°2: 19 años (azul UPM) y N°5: 18 años (verde UAT)

Comparaciones globales. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2164.895	1	.000

Comparaciones por parejas. Caballos viejos del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

		2		5	
	Factor (#Caballo)	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2			2164.895	.000
	5	2164.895	.000		

6.- TODOS LOS CABALLOS DEL GRUPO UPM/UAT

MONTA N°1. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.

Comparaciones globales. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°1.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8211.939	5	.000

Comparaciones por parejas. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°1.

Factor (#Caballo)	1		2		3		4		5		6	
	Chi- cuadrado	Sig.										
1			17.814	.000	951.263	.000	1.725	.189	2927.367	.000	5.862	.015
2	17.814	.000			749.520	.000	8.496	.004	2640.450	.000	43.671	.000
3	951.263	.000	749.520	.000			887.980	.000	755.523	.000	1068.258	.000
4	1.725	.189	8.496	.004	887.980	.000			2840.463	.000	13.899	.000
5	2927.367	.000	2640.450	.000	755.523	.000	2840.463	.000			3081.910	.000
6	5.862	.015	43.671	.000	1068.258	.000	13.899	.000	3081.910	.000		

MONTA N°2. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.

Comparaciones globales. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°2.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9153.835	5	.000

Comparaciones por parejas. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°2.

Comparaciones por parejas												
Factor (#Caballo)	1		2		3		4		5		6	
	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.	Chi-cuadrado	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)			96.741	.000	.237	.626	7.934	.005	2801.188	.000	.000	1.000
2	96.741	.000			106.143	.000	50.473	.000	2142.117	.000	96.686	.000
3	.237	.626	106.143	.000			10.904	.000	2831.942	.000	.237	.626
4	7.934	.005	50.473	.000	10.904	.000			2624.029	.000	7.928	.005
5	2801.188	.000	2142.117	.000	2831.942	.000	2624.029	.000			2799.833	.000
6	.000	1.000	96.686	.000	.237	.626	7.928	.000	2799.833	.000		

MONTA N°3. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo

Comparaciones globales. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°3.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8866.856	5	.000

Comparaciones por parejas. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Montaña n°3.

	Factor (#Caballo)	1		2		3		4		5		6	
		Chi-cuadrado	Sig.										
Log Rank	1			72.130	.000	.005	.942	.846	.358	2686.307	.000	5.647	.017
(Mantel-Cox)	2	72.130	.000			71.087	.000	88.147	.000	2104.652	.000	116.193	.000
	3	.005	.942	71.087	.000			.987	.320	2686.248	.000	6.008	.014
	4	.846	.358	88.147	.000	.987	.320			2748.125	.000	2.130	.144
	5	2686.307	.000	2104.652	.000	2686.248	.000	2748.125	.000			2836.445	.000
	6	5.647	.017	116.193	.000	6.008	.014	2.130	.144	2836.445	.000		

MONTA N°4. De todos los caballos del grupo UPM/UAT.

CABALLO N°1: 9 años azul, **CABALLO N°2:** 19 años verde, **CABALLO N°3:** 7 años beige, **CABALLO N°4:** 5 años morado, **CABALLO N°5:** 18 años amarillo, **CABALLO N°6:** 3 años rojo.

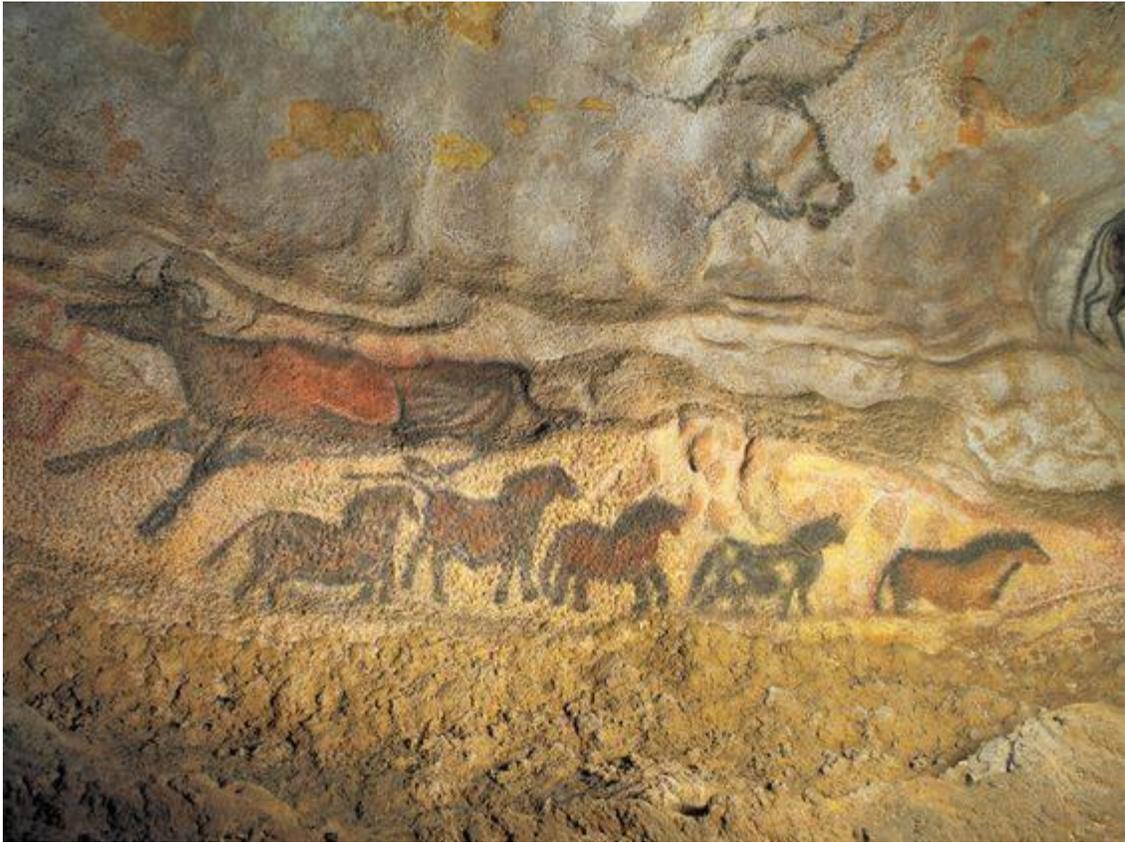
Comparaciones globales. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9228.923	5	.000

Comparaciones por parejas. Todos los caballos del grupo UPM/UAT. Monta n°4.

Factor (#Caballo)	1		2		3		4		5		6	
	Chi-cuadrado	Sig.										
Log Rank (Mantel-Cox)			78.532	.000	3.381	.066	.180	.671	2778.363	.000	7.640	.006
2	78.532	.000			113.150	.000	71.396	.000	2164.895	.000	132.658	.000
3	3.381	.066	113.150	.000			5.120	.024	2898.427	.000	.862	.353
4	.180	.671	71.396	.000	5.120	.024			2750.879	.000	10.157	.001
5	2778.363	.000	2164.895	.000	2898.427	.000	2750.879	.000			2955.805	.000
6	7.640	.006	132.658	.000	.862	.353	10.157	.001	2955.805	.000		

NÚMERO DE REGISTRO: 03-2016-111010492400-01 EN EL REGISTRO PÚBLICO DEL DERECHO DE AUTOR



Lascaux