



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES DE CONGELACIÓN  
UTILIZADOS EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE  
ESPERMATOZOIDES EQUINOS OBTENIDOS DE EPIDÍDIMO“**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**OSWALDO RAFAEL LÓPEZ ÁVILA**

**Asesor:**

**MVZ. Ana Myriam Boeta Acosta**

México, D.F.

2015



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.

## **DEDICATORIA**

Agradezco primeramente a mi universidad, la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado una educación y enseñanza de excelente calidad.

En segundo lugar agradezco a mi grandiosa facultad, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, la cual me brindó las herramientas teóricas y prácticas para mi formación académica y mi competencia profesional.

En tercer lugar y no menos importante a la MVZ. Ana Myriam Boeta Acosta, quien fungió como mi asesora académica y personal. Además de brindarme tiempo y conocimientos que hicieron abrirme paso en este maravilloso mundo de la reproducción equina.

Agradezco totalmente a aquellos seres (caballos, perros, gatos, conejos, etc.) que vivos o muertos me otorgaron de basta experiencia práctica.

Por último, agradezco a todas las personas involucradas en este proyecto, que a mi parecer resultó todo en un éxito.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dedico el presente escrito a:

Mi ejemplo, mi ídolo y mi modelo a seguir, mi padre; quien a pesar de todas las dificultades que nos presenta la vida ofrece todo por su familia.

Mi consejera, mi mejor amiga, la mejor sonrisa frente a la adversidad, mi madre. A ti que en momentos de debilidad física y emocional tienes el mejor remedio con tu alegría y tu sonrisa. Quien a pesar de todos los desvelos y preocupaciones sigues adelante con nosotros, muchas gracias.

Mi defensora, mi motivo de seguir adelante, mi hermana. A ti que eres la primera en defenderme en todos los problemas y circunstancias en las que nos encontramos. Por ti trataré de ser el mejor ejemplo.

Mi compañera, mi amiga, mi apoyo incondicional y sobre todo mi complemento, Lili. A ti que me has demostrado a base de cariño y amor no ha imposibles y que ante todo debemos remar este barco juntos.

A mi hermano, mi complice de travesuras y aventuras, Omar. Que me has enseñado que nuestro cariño sigue fortaleciéndose a pesar de los

años. Que aún a esta edad, podemos seguirnos divirtiéndonos como niños y aprender como adultos.

A ti Tita, que me has inculcado los valores para poder enfrentarme ante la sociedad y demostrarme a mi mismo lo valioso que soy. Por transmitirme los sentimientos que mi abuelo Juan hubiera profesado en cada logro.

A ti Melannie, que siempre trataré de ser el mejor ejemplo para ti, a pesar de las circunstancias de la vida.

A ti Sandra Díaz, que me brindaste tu tiempo, tu paciencia y tus conocimientos para el logro de esta investigación, gracias por comprenderme y por apoyarme.

A mis mascotas que fueron muchas en toda la vida universitaria. Quienes a base de cuidados y algunas enfermedades pude establecer un mejor criterio veterinario.

A muchas personas que han crecido conmigo y me han apoyado tanto en mi vida personal como en la profesional. A todos ustedes dedico la presente investigación, la cual se realizó con mucha dedicación y esfuerzo.

# CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
HIPOTESIS.....	46
OBJETIVOS.....	46
MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	59
RESULTADOS.....	60
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70

## RESUMEN

LÓPEZ ÁVILA OSWALDO RAFAEL. Evaluación de dos diluyentes de congelación utilizados en la criopreservación de espermatozoides equinos obtenidos de epidídimo (bajo la dirección de MVZ. Ana Myriam Boeta Acosta)

En diferentes especies se han usado amidas y lipoproteínas de baja densidad como parte de diluyentes de congelación seminal; sin embargo en la reproducción equina aún no se ha definido totalmente su uso para diluir espermatozoides obtenidos del epidídimo. En el presente estudio se comparó un diluyente elaborado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM con un diluyente comercial. Se trabajó con espermatozoides obtenidos de epidídimo equino provenientes de diez sementales destinados para rastro. Se realizó un análisis estadístico (Prueba de Muestra de t pareadas) el cual comparó las medias entre variables. La variable que mostró diferencia estadística ( $P < 0.5$ ) fue la motilidad a la descongelación en la comparación entre ambos diluyentes siendo el mejor el PUMA-EXTENDER; sin embargo los resultados obtenidos en las pruebas de HOST y prueba de tinción acrosomal con azul de Coomassie no mostraron diferencia estadística entre diluyentes mostrando resultados muy similares. En conclusión, ambos diluyentes mostraron resultados muy parecidos, lo que demuestra que el uso de las amidas y las lipoproteínas poseen cualidades crioprotectoras del espermatozoide equino.

## **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES DE CONGELACIÓN UTILIZADOS EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS OBTENIDOS DE EPIDÍDIMO**

### **INTRODUCCIÓN**

En el equino se han desarrollado varias técnicas para la obtención de semen que buscan optimizar el manejo del semental. La más común es la vagina artificial, aunque en ocasiones, dependiendo las circunstancias en la que se encuentre el semental, se utiliza la electroeyaculación. Sin embargo, ninguna de estas técnicas permite obtener semen a partir de un animal que ha muerto o que debido a su condición de salud deba ser sacrificado. En estos casos la mejor alternativa para la obtención de semen es a partir de la cauda epididimal.<sup>1,2</sup>

La cauda epididimal es el último segmento de los tres que conforman al epidídimo: cabeza, cuerpo y cauda. Cada zona tiene diferente estructura histológica y produce distintas secreciones con el objeto de proporcionar el medio adecuado para madurar y mantener a los espermatozoides. La función principal de la cabeza del epidídimo es remover secreciones de los túbulos seminíferos y añadir nuevas que contribuyan a la maduración espermática. El cuerpo del epidídimo, se caracteriza por secretar sustancias que ayudan a mantener viables a los espermatozoides, mientras que en la cola se almacenan y se mantienen en un estado de bajo metabolismo hasta ser eyaculados.<sup>3</sup>

La obtención de semen del epidídimo se puede realizar incluso durante los primeros minutos después de la muerte del semental, por lo que es una herramienta valiosa para conservar el material genético del animal.<sup>1</sup>

Se han investigado diferentes técnicas para la obtención de semen epididimal, como el lavado retrógrado y la técnica de flotación (swim up), siendo la primera con la que se ha obtenido mayor cantidad de espermatozoides viables y con menor contaminación de células endoteliales y/o eritrocitos. Una vez obtenidos, los espermatozoides de la cola de epidídimo pueden ser congelados y mantenidos en buen estado si se utilizan diluyentes y crioprotectores adecuados.<sup>2</sup>

Un agente crioprotector puede ser definido como una sustancia o medio que mejora la supervivencia de las células congeladas y criopreservadas. Se ha sugerido que el crioprotector ideal debe tener bajo peso molecular, gran solubilidad en medio acuoso y baja toxicidad. Desde el año 1950 se comenzó a utilizar el glicerol como agente crioprotector para espermatozoides, obteniéndose resultados adecuados. Recientemente se comenzaron a utilizar sustancias conocidas como amidas, las cuales han sido comparadas con las propiedades crioprotectoras del glicerol, para obtener la mayor eficacia posible. Se ha encontrado que las amidas producen menor daño osmótico a los espermatozoides del garañón. El objetivo de ésta investigación fue el obtener de manera retrógrada espermatozoides de la cola del epidídimo de caballos y comparar la eficiencia de dos diluyentes de criopreservación por medio de las

pruebas de hipo-osmolaridad y de la técnica de tinción con azul de Coomassie.<sup>1,2,4</sup>

## **REVISION DE LITERATURA**

### **ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR**

Para evaluar reproductivamente a un garañón debemos conocer la anatomía y funcionamiento del aparato reproductor, el cual está constituido por el escroto, los testículos, los epidídimos, los conductos deferentes, las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) y el pene junto con sus músculos. Las anormalidades anatómicas en cualquiera de estos órganos pueden afectar la calidad y eficiencia reproductiva del garañón. Estos problemas pueden ser generados desde la embriogénesis y durante el desarrollo fetal, tanto por defectos congénitos como por la exposición a agentes ambientales durante la gestación. <sup>5</sup>(FIGURA 1)

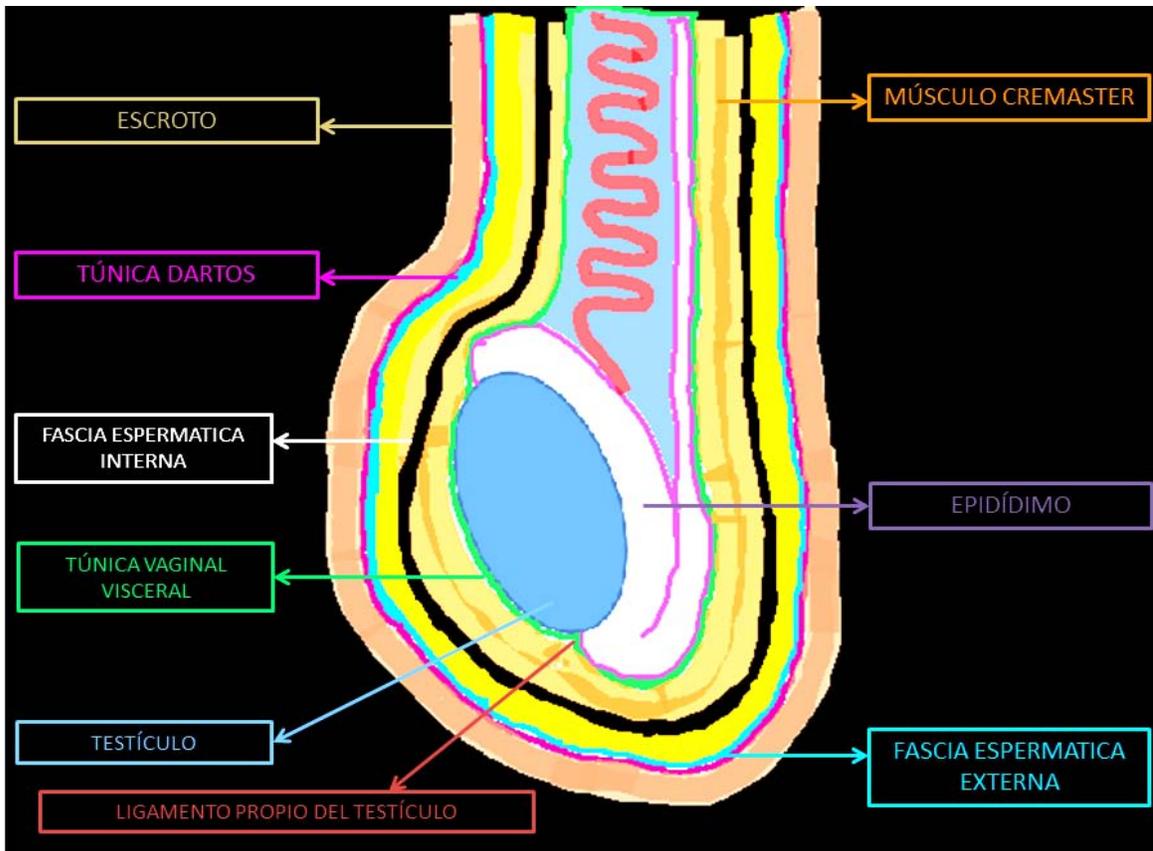


Figura 1.- Esquema del aparato reproductor del semental equino. (Dibujo propio)

## Escroto

Es el saco que contiene a los testículos, en su parte interna se encuentra la túnica vaginal visceral que envuelve a cada testículo y el septo (septum escroti) que los separa. El escroto está constituido por cuatro capas, en donde la más externa es la piel, que contiene un gran número de glándulas sudoríparas que ayudan a mantener una menor temperatura ( $33^{\circ}\text{C}$ ) para la apropiada función testicular. La siguiente capa internamente es la túnica dartos, que se caracteriza por contener fibras entrelazadas de músculo liso. Estas fibras contribuyen a mantener la temperatura apropiada, al elevar (en caso de temperaturas bajas) o descender (en

temperaturas altas) los testículos para acercarlos o alejarlos del cuerpo y así facilitar o impedir la pérdida de calor.<sup>5</sup>

El tercer segmento llamado fascia escrotal es de tejido conectivo, la cual le otorga al testículo gran movilidad tanto vertical como horizontal. Normalmente evita una rotación de 180° de los testículos.<sup>5</sup>

La capa más interna del escroto está constituida por las túnicas vaginales parietal y visceral. La túnica vaginal parietal es un saco membranoso que se extiende desde la cavidad abdominal, a través del canal inguinal, hasta el fondo del escroto, rodeando a los dos testículos, a los epidídimos y al cordón espermático. La túnica vaginal visceral es la hoja interna que está en contacto directo con los testículos, envolviendo a cada uno por separado. El espacio que se encuentra entre la túnica vaginal parietal y la túnica vaginal visceral contiene un fluido acuoso, que sirve como lubricante y facilita el deslizamiento de los testículos dentro del saco escrotal. En garrones adultos hay una menor cantidad de éste fluido, por lo que se pueden producir adherencias del testículo, lo que ocasiona una menor movilidad del testículo y ruptura de pequeños capilares en las membranas, produciéndose cierto trauma tanto al escroto como a los testículos. Se ha observado también una reducción en la efectividad en los mecanismos que conservan la temperatura.<sup>5</sup>

## Testículos

Se consideran los órganos sexuales primarios del macho debido a que es el sitio en el que se producen los gametos masculinos (espermatozoides), así como la producción de las hormonas esteroidales principalmente la testosterona.<sup>5</sup>

Los testículos del equino tienen forma ovoide y su tamaño varía considerablemente. En el animal adulto cada uno de ellos mide en promedio 8 a 14 cm de largo, 5 a 8 cm de ancho, y pesan aproximadamente 225 gramos. Tanto la edad del animal como la época del año afectan estos parámetros; un testículo en la temporada reproductiva pesa más que en la época en que las hembras están en época anovulatoria. Es importante mencionar que el volumen y el peso testicular están íntimamente relacionados con la producción de espermatozoides y la posibilidad de su obtención a partir del epidídimo.<sup>5,6</sup>

Como cualquier órgano parenquimatoso, el testículo presenta dos zonas principales, cápsula y parénquima. La cápsula (túnica albugínea) está en íntimo contacto con la túnica vaginal visceral. Desde la túnica albugínea se extienden fibras de tejido conectivo de soporte que penetran en el parénquima y lo dividen en lóbulos (*lobuli testis*).<sup>5,6</sup>

El parénquima está constituido por túbulos seminíferos (*tubuli seminiferi*), y tejido intersticial. En el garañón joven el parénquima está ligeramente pigmentado, de color café de tonalidad clara; moderadamente pigmentado en un garañón de 4 a 5

años de edad y muy pigmentado con una coloración café más oscuro en un garañón viejo.<sup>6</sup>

Los túbulos seminíferos se encargan de producir a los espermatozoides y mantenerlos mientras se dirigen hasta su salida al conducto eferente. Cada túbulo está delimitado por epitelio seminífero, el cual contiene células de Sertoli y células germinales. Las células de Sertoli y las espermatogonias se encuentran en contacto con la membrana basal de los túbulos y se extienden hacia la luz del túbulo en un patrón radial, ocupando 15-25% de epitelio seminífero en un garañón adulto.<sup>6</sup> (FIGURA 2)

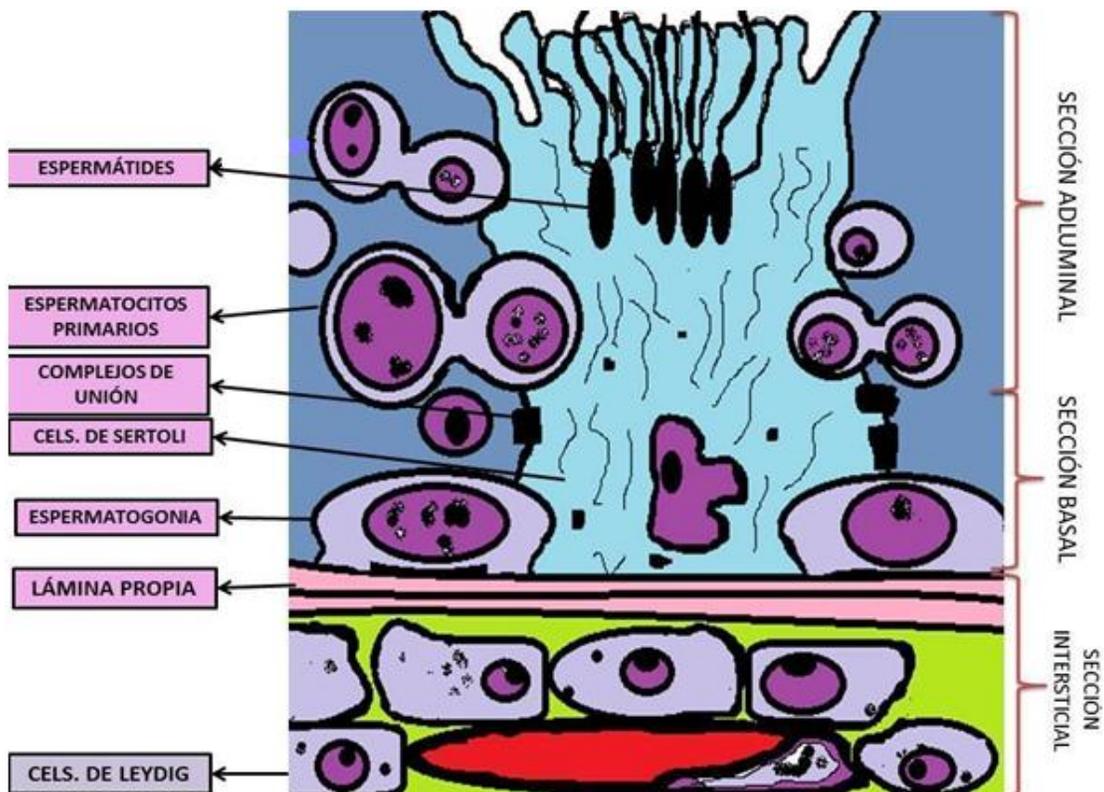


Figura 2.- Representación esquemática de la histología del testículo equino. Adaptado de L.R. França et al.,(2005)

El túbulo seminífero está delimitado por una lámina propia que está conformada por fibroblastos, células mioideas (células especializadas de músculo liso) y laminina. Las contracciones de las células mioideas ayudan a mover los espermatozoides y fluidos desde los túbulos seminíferos hacia los conductos eferentes.<sup>5</sup>

Las células germinales son la característica más sobresaliente del epitelio seminífero, en cada túbulo se encuentran varias capas de células en distintos estados de su desarrollo. En la parte más basal, se encuentran las espermatogonías de reserva, en capas sucesivas las espermatogonias en proceso de diferenciación, los espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios y las espermatidas en distintas etapas de desarrollo. Todas estas células se encuentran en íntimo contacto con las células de Sertoli y rodeadas por la membrana de dichas células, que actúan como células de soporte. Los túbulos seminíferos tienen una porción contorneada, que en cada uno de sus extremos se transforma en un túbulo recto que constituye parte del mecanismo a través del cual los espermatozoides pasan del epitelio seminífero al epidídimo. Todos los túbulos rectos de un testículo convergen para conformar la rete testis. De cada rete testis salen 13 a 15 conductos eferentes que se unen inmediatamente al epidídimo.<sup>5</sup>

### *Células de Sertoli*

Como se ha mencionado antes, las células de Sertoli yacen en la lámina propia del túbulo seminífero y su extenso citoplasma se extiende alrededor de las células germinales que constituyen la mayor parte del epitelio seminífero.<sup>7</sup>

Las funciones de las células de Sertoli son entre muchas otras, fagocitosis de restos o fragmentos que podrían impedir el trabajo correcto de la espermatogénesis, soporte estructural para el mantenimiento de las células germinales, secreción de fluidos y proteínas necesarias para los espermatozoides además de regular la espermatogénesis y formación de la barrera hemato-testicular.<sup>7</sup>

Durante la espermatogénesis muchas células sufren apoptosis y son fagocitadas para evitar que no se conviertan en un obstáculo para el paso de espermatozoides. Las células de Sertoli también secretan sustancias importantes, algunas de las cuales también son producidas en otras partes del organismo, pero otras solo son producidas en los túbulos seminíferos. Algunas de estas sustancias son señales que controlan la división y diferenciación de las células germinales. Las células de Sertoli también producen proteínas necesarias para transportar la vitamina A y hierro que se requieren para el desarrollo de las células germinales. Por su papel regulador, varias hormonas y otras sustancias que afectan la espermatogénesis actúan en realidad sobre las células de Sertoli, las cuales a su vez producen señales que regulan la espermatogénesis.<sup>7</sup>

Las células de Sertoli también secretan inhibina que es una hormona, de naturaleza proteica que regula la secreción de FSH y que a nivel local participa en la regulación de la espermatogénesis y en el mantenimiento de espermatozoides a nivel epididimal.<sup>7</sup>

Para que las células de Sertoli funcionen adecuadamente deben ser estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH) y la testosterona.<sup>7</sup>

### *Barrera hemato-testicular*

Entre las células de Sertoli existen uniones ocluyentes (tight junctions), estas unen de forma estrecha la membrana de dos células adyacentes, separando los compartimientos, basal y adluminal; por lo que impiden el paso de células o de moléculas complejas entre las células de Sertoli. Esta división se denomina barrera hemato-testicular y se caracteriza por formar una barrera entre las células germinales (excepto las espermatogonias indiferenciadas) y el torrente sanguíneo, con la finalidad de evitar que el sistema inmune reaccione en contra de las células que solamente son producidas en el testículo después de la pubertad. Esto es debido a que los espermatozoides (y la mayor parte de las células germinales) son consideradas por el sistema inmune como “extrañas” al organismo por no haber estado presentes durante la vida fetal en el momento en el que se realiza el inventario y reconocimiento de los antígenos propios. La barrera hemato-testicular también restringe el flujo de macromoléculas y otros componentes del fluido intersticial hacia los espermatozoides y espermátidas. Es

importante mencionar que cualquier daño a la barrera hemato-testicular causada por diferentes circunstancias puede desencadenar la reacción inmune contra las células del testículo, provocando esterilidad.<sup>5</sup>

### *Células de Leydig*

En el tejido intersticial que se localiza por fuera del túbulo seminífero se encuentra el tipo celular más importante “células de Leydig; las cuales se encuentran muy cerca de los vasos sanguíneos y los canales linfáticos. Su función principal es la secreción de hormonas esteroideas (principalmente testosterona), que ayudan a estimular y regular la función del epitelio seminífero, la función del eje hipotálamo-hipofisis, la función de las glándulas accesorias, así como todos los caracteres sexuales secundarios y la conducta sexual del macho.<sup>5</sup>

Las células de Leydig secretan constantemente cantidades basales de testosterona y otras hormonas. La secreción de estas hormonas es estimulada por la LH que es secretada en forma pulsátil por la hipófisis para estimular a las células de Leydig y esto mismo incrementa la secreción de testosterona. En consecuencia los túbulos seminíferos están expuestos a altas concentraciones de testosterona para mantener la espermatogénesis de manera normal.<sup>5</sup>

Las células de Leydig sufren cambios estructurales a medida que avanza la edad del caballo. En el momento en que el semental comienza a madurar las células de Leydig inmaduras son reemplazadas gradualmente por células adultas, las cuales

contienen mayor cantidad de lípidos y están unidas por numerosas interdigitaciones, además de que producen mayor cantidad de testosterona.<sup>5</sup>

### *Control de la temperatura testicular*

El escroto sirve para cubrir y proteger al testículo, sin embargo, una de sus funciones principales es la regulación de la temperatura testicular y del epidídimo. Esta regulación se da de dos maneras importantes: la transferencia de calor vascular y cambios en la posición de los testículos con respecto a la pared abdominal. La temperatura ideal de los testículos debe ser menor de la corporal para el óptimo funcionamiento de la espermatogénesis.<sup>7</sup>

El semental mantiene una fertilidad normal hasta 3 a 4 días después de un daño severo a los testículos o un incremento marcado en la temperatura corporal. Por otra parte, el incremento en la temperatura en la cola del epidídimo provoca un descenso en la calidad seminal y en la resistencia de los espermatozoides.<sup>7</sup>

La regulación de la temperatura del testículo y del epidídimo depende de una acción conjunta entre el escroto, el plexo pampiniforme, la túnica dartos y el músculo cremaster. La sangre arterial que proviene del interior del cuerpo del semental viene a una temperatura cercana a 39 °C. En cambio la temperatura de la sangre en las venas que drenan los testículos es de 33 °C debido a que ha circulado en las venas superficiales del testículo, que están en estrecho contacto con el escroto, a través del cual transfieren calor hacia el ambiente exterior. La arteria y venas testiculares establecen un íntimo contacto con el cordón

espermático a nivel del plexo pampiniforme, en la cual los vasos venosos se enrollan alrededor de la arteria espermática. Debido a ese contacto tan estrecho entre venas y arterias se produce una transferencia de calor desde la sangre arterial “caliente” a la sangre venosa “fría”. En consecuencia, la sangre arterial que sale del plexo pampiniforme para dirigirse al tejido testicular ya ha reducido su temperatura a 34 °C o 35 °C, la temperatura ideal para mantenimiento del funcionamiento testicular.<sup>7</sup>

La posición de los testículos con respecto a la pared abdominal es importante para mantener la temperatura de los testículos dentro del rango óptimo. Este movimiento de los testículos está dado por la acción del músculo liso del dartos.<sup>7</sup> En ambiente frío las fibras musculares de la túnica dartos se contraen con la finalidad de acercar al testículo a la pared abdominal y así disminuir la pérdida de calor. En un ambiente cálido la túnica dartos se relaja para hacer al escroto más penduloso y maximizar el enfriamiento de la sangre venosa testicular por contacto con la piel escrotal, que a su vez es enfriada por la evaporación del sudor producido por las abundantes glándulas sudoríparas.<sup>7</sup>

### *Descenso testicular*

El descenso testicular en el equino ocurre entre los últimos 30 días de la gestación y los primeros 10 días de vida del potro. Involucra dos fenómenos diferentes. Primero, el testículo debe viajar desde una posición retroperitoneal en la cavidad abdominal hasta el escroto. Este movimiento involucra una regresión rápida, de

una estructura ligamentosa llamada gubernáculo. El segundo fenómeno consiste en el descenso testicular per se. Junto con el testículo descienden dos capas del peritoneo, que son la túnica vaginal visceral y la túnica vaginal parietal.<sup>5,8</sup>

En el feto los testículos se encuentran en una posición retroperitoneal y están unidos caudalmente por el gubernáculo, el cual se extiende caudalmente hasta el sitio donde posteriormente estará el escroto. Conforme el cuerpo del feto crece, los testículos son jalados por el gubernáculo, a través del conducto inguinal, debido a que el gubernáculo comienza a encogerse y está “anclado” al escroto. Este desplazamiento hacia afuera causa que el peritoneo cubra alrededor del cordón espermático y los testículos.<sup>5,8</sup>

Después del descenso completo del testículo, se podrá observar que el proceso vaginal (el espacio entre túnica vaginal parietal y visceral) es continuo con la cavidad peritoneal y el testículo está rodeado por una doble capa de peritoneo. La capa de peritoneo inmediata al testículo es la túnica vaginal visceral y la más lejana es la túnica vaginal parietal. La regresión del gubernáculo es el resultado del paso final a través del canal inguinal y la orientación del peritoneo alrededor del testículo en el escroto.<sup>5,8</sup>

Como ya se mencionó, en el garrón, los testículos entran al escroto justo antes o después del nacimiento. La falla en el descenso testicular se denomina criptorquidismo. El término “cripto” significa escondido o no visible y “orchis” significa testículo en griego. Entre el 3 al 5% de los neonatos sufren esta

patología. El criptorquidismo bilateral tiene como resultado la esterilidad debido a que la espermatogénesis no puede llevarse a cabo a la temperatura de la cavidad abdominal. Durante las primeras semanas después del nacimiento, el gubernáculo puede ser un poco largo, por lo que puede ser confundido con un testículo. Al nacimiento el peso de cada testículo es de 5-20 gramos y su tamaño incrementa muy poco durante los primeros diez meses de edad. El desarrollo de los testículos comienza generalmente entre los 12 y los 18 meses de edad, pero la edad en la que ocurre el crecimiento más rápido varía considerablemente entre individuos.<sup>5,8</sup>

### *Cordón espermático*

El cordón espermático se extiende desde el anillo inguinal abdominal y suspende al testículo en el escroto, actuando como un pasaje para el ducto deferente, los nervios y los vasos sanguíneos asociados al testículo.<sup>5,8</sup>

El músculo cremaster se encuentra lateralmente al cordón espermático. Las fibras musculares de este músculo ayudan al soporte del testículo y su contracción en situaciones de peligro los acerca al cuerpo para protegerlos. Como ya se mencionó, el cordón espermático de cada testículo incluye una arteria testicular muy tortuosa y un conjunto de venas del llamado plexo pampiniforme, que al enrollarse alrededor de la arteria sirve como un sistema de intercambio de calor.<sup>5</sup>

## **Epidídimo**

Está dividido anatómicamente en 3 partes: cabeza, cuerpo y cola. En la parte proximal del epidídimo los conductos deferentes (13 a 15) se unen para formar un solo ducto muy estrecho llamado el ducto epididimal. Este ducto tiene una longitud aproximada de 45 metros, está muy enrollado y mantiene un patrón tortuoso desde la cabeza hasta la cola del epidídimo, lo que permite que el conducto esté empaquetado en un órgano (el epidídimo) de pocos centímetros de longitud externa. Al final del epidídimo, el conducto que sale de su cola tiene adopta un patrón recto hasta el conducto deferente.<sup>5,8</sup>

La cabeza del epidídimo se encuentra unida íntimamente al testículo. Esta parte del epidídimo es fundamental para la maduración de los espermatozoides y se encarga de reabsorber grandes cantidades de líquido secretado por los testículos, reemplazando las secreciones provenientes de este órgano por secreciones epididimales.<sup>5,8</sup>

El cuerpo del epidídimo es una estructura cilíndrica unida a la superficie dorsal del testículo, la cual recorre desde su extremo craneal, en el que se encuentra la cabeza del epidídimo, hasta el extremo caudal, en el que se localiza la cauda, la cual externamente parece un abultamiento en cuyo interior se encuentran enrollados varios metros de conducto epididimal.<sup>5,8</sup>

La cauda epididimal es una estructura especializada para el mantenimiento de los espermatozoides hasta su posterior eyaculación. Es una zona dotada de algunas secreciones vitales para mantenerlos viables y capaces de fertilizar.<sup>5,8</sup>

### **Conductos deferentes**

Los conductos deferentes son las estructuras tubulares que continúan después del epidídimo y se extienden hasta la uretra. Antes de llegar a la uretra el diámetro del conducto deferente aumenta, formando una estructura denominada ámpula o ampolla. El ámpula tiene un diámetro de 18mm, comparado con el diámetro del resto del conducto deferente, que es de 4 a 5mm. El aumento del diámetro en la región ampular se debe a un adelgazamiento de la pared asociado a la presencia de criptas y glándulas.<sup>5,8</sup>

### **Glándulas sexuales accesorias**

Las glándulas accesorias incluyen a las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Las dos vesículas seminales son estructuras alargadas que forman sacos ciegos de 15 a 20 cm de largo y 5 cm de diámetro. La próstata es una glándula nodular firme, localizada alrededor de la uretra pélvica, que contiene dos lóbulos conectados por un istmo. Las glándulas bulbouretrales se encuentran a cada lado de la uretra pélvica, cerca del arco isquiático.<sup>5</sup>

## **Uretra**

La uretra es un órgano tubular que se extiende desde la vejiga, primero como una estructura independiente (uretra pélvica) que después queda incluida en el pene (uretra peneana) y al final se asoma por la punta del pene formando un pequeño proceso llamado proceso uretral. En la uretra pélvica se descargan los fluidos y espermatozoides provenientes del epidídimo a través de los conductos deferentes, así como las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. La porción peneana está rodeada por el cuerpo esponjoso del pene, el cual es un área de tejido eréctil y cavernoso. La uretra sirve como un canal excretor compartido por el aparato urinario y el aparato reproductor ya que a través de ella se expulsa la orina y el semen.<sup>5</sup>

## **Pene**

El pene es el órgano de copulación del macho. Consiste de base, cuerpo, y glande. El pene tiene como componentes funcionales dos cuerpos cavernosos, un cuerpo esponjoso, la corona del glande, la uretra peneana, el músculo bulboesponjoso, nervios y vasos sanguíneos.<sup>5</sup>

El pene es de tipo vascular constituido en gran parte por tejido músculo-cavernoso, lo que le permite incrementar su longitud y diámetro en más del 50%, durante la erección. Cuando no está erecto el pene (mantenido en gran parte dentro de la cavidad abdominal) mide 50 cm de largo y 2.5 a 5 cm de diámetro.<sup>5</sup>

## ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso de divisiones y diferenciación celular que tiene como resultado la formación de espermatozoides a partir de células germinales indiferenciadas llamadas espermatogonias. La duración de este proceso en el equino es en promedio de 57 días.<sup>10</sup>

Los espermatozoides son producidos en el epitelio seminífero de la porción contorneada de los túbulos seminíferos. Como ya se mencionó, el epitelio seminífero de un garañón adulto está compuesto de células somáticas, denominadas células de Sertoli, y de diferentes tipos de células germinales como espermatogonias, espermaticitos primarios, secundarios y espermátidas.<sup>8,11, 12,13</sup>

Debido a la duración del espermatogénesis, el intervalo entre un evento que la afecta y el descenso de la calidad seminal puede ser de hasta dos meses. De la misma forma, se requiere un intervalo de dos meses para la restauración de la espermatogénesis después un daño como el producido por un incremento de la temperatura testicular o la administración de hormonas esteroides.<sup>12</sup>

El proceso de espermatogénesis tiene tres fases características: espermatocitogénesis (divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias, que se van diferenciando hasta formar espermaticitos primarios), meiosis y espermiogénesis (metamorfosis de espermátidas a espermatozoides).<sup>8,12,13</sup>

## **Espermatocitogénesis**

La espermatocitogénesis dura aproximadamente 19 días. Durante este proceso se llevan a cabo varias divisiones mitóticas mientras las espermatogonias se van diferenciando.<sup>8,12,13</sup>

Al inicio del proceso, una espermatogonia de reserva sufre una división mitótica, quedando una de las hijas como espermatogonia de reserva mientras la otra se diferencia (espermatogonia primaria) y continua sufriendo divisiones sucesivas. Las espermatogonias que se forman a partir de la primera división se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos cada vez que se dividen hasta que son ocho espermatogonias secundarias. Las células que se producen en cada división subsecuente también se mantendrán unidas por puentes citoplasmáticos, y cada división se realizará en forma sincronizada en todas las células. Algunas de las primeras espermatogonias se degeneran, especialmente en la temporada no reproductiva. En cambio, durante la temporada reproductiva la mayoría de las ocho espermatogonias secundarias se dividen en espermatogonias terciarias, las cuales se consideran como células diferenciadas debido a que son funcionalmente diferentes a las espermatogonias primarias.<sup>8,12,13</sup>

Las espermatogonias terciarias se dividen por mitosis para formar espermatogonias cuaternarias, las cuales a su tiempo se dividen en

espermatogonias tipo b; en época no reproductiva las espermatogonias cuaternarias se degeneran.<sup>8,12,13</sup>

Las espermatogonias tipo b se dividen por mitosis para formar espermatogonias secundarias tipo b, que en época reproductiva dan lugar a los espermatoцитos primarios.<sup>8,12,13</sup>

## **Meiosis**

La siguiente fase de la espermatogénesis, denominada meiosis, tiene la misma duración que la espermatocitogénesis. Durante la primera división meiótica se realiza intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos del espermatoцитo primario, que al terminar la división forma espermatoцитos secundarios. En la segunda división meiótica se reduce a solo un juego de cromosomas de la especie el número de cromosomas en cada una de las células hijas, que son las células haploides denominadas espermátidas.<sup>13</sup>

## **Espermiogénesis**

La última etapa de la espermatogénesis es la espermiogénesis, la cual está caracterizada por la metamorfosis de las espermátidas hasta transformarse en espermatozoides, los cuales se liberan del epitelio seminífero hacia la luz del túbulo. Al iniciar el proceso las espermátidas tienen una forma característica de célula ligeramente alargada.<sup>13</sup> De los espermatozoides producidos no todos son

liberados en la espermiación; existe una degeneración considerable de células germinales aún durante la época reproductiva.<sup>13</sup>

El correcto funcionamiento de la espermatogénesis es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Los órganos que conforman este eje secretan hormonas y otras sustancias que serán de vital importancia para el funcionamiento del aparato reproductor.<sup>13</sup>

## EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADAL

Las hormonas más importantes de este eje son la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que es producida y secretada en el hipotálamo; la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH), que son producidas por la hipófisis; los andrógenos y estrógenos son producidos por las células de Leydig del testículo, así como estrógenos e inhibina producidos por las células de Sertoli.<sup>14</sup>

En el garrón, al recibir un estímulo apropiado el hipotálamo libera GnRH en un patrón pulsátil, lo que estimula la producción y liberación de gonadotropinas.<sup>14</sup>

La LH estimula la producción y liberación de testosterona por las células de Leydig mientras que la FSH se une a las células de Sertoli para estimular la secreción de estrógenos, inhibina, activina, proteína ligadora de andrógenos (ABP por sus siglas en inglés), transferrina, factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y otros factores importantes para la espermatogénesis.<sup>14</sup>

Las proteínas y hormonas producidas en el testículo retroalimentan al hipotálamo y a la hipófisis para modular la secreción de GnRH, LH y FSH.<sup>14</sup> (FIGURA 3)

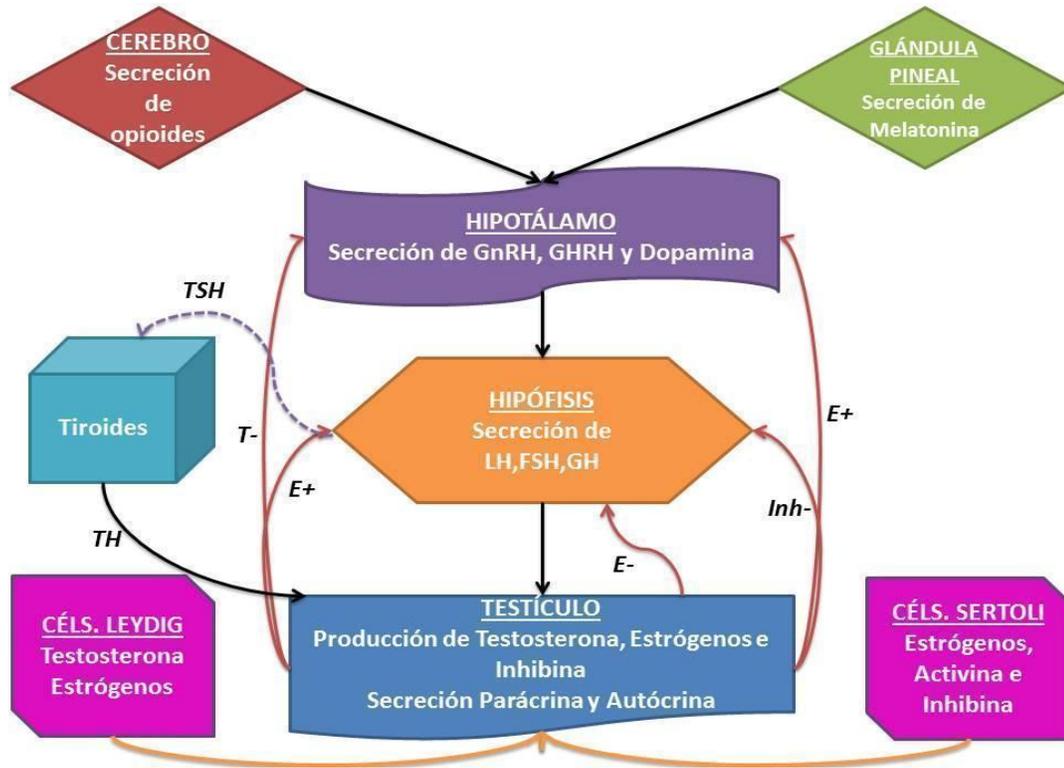


FIGURA 3.- Esquema de Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal, (TSH) Hormona estimulante tiroidea, (T) Testosterona, (E) Estrógenos, (Inh) Inhibina, (TH) Hormona liberadora tiroidea. La melatonina que se encuentra en la glándula pineal y los opioides liberados del cerebro regulan la GnRH en una retroalimentación negativa. La GnRH regula la liberación de la FSH y LH, ésta última regula directamente a las células de Leydig; las cuales producen testosterona y estrógenos en un semental adulto. La FSH es la mayor reguladora de actividad en las células de Sertoli, mismas que secretan estrógenos, inhibina y activina. La GnRH también controla la producción y secreción de la GH. Los estrógenos regulan la liberación de GnRH y LH. La testosterona inhibe la acción de la GnRH, sin embargo no tiene acción en la liberación de LH a nivel de la glándula pituitaria. Adaptado de Samper, 2009.

## TRANSPORTE ESPERMÁTICO EN EL EPIDÍDIMO

Después de salir del testículo los espermatozoides entran a los conductos eferentes, que son 10 a 20 túbulos que están unidos al ducto epididimal, a través del cual los espermatozoides son transportados, hasta su almacenamiento. Existen dos o tres zonas de maduración en la cabeza y cuerpo del epidídimo además de una más de almacenamiento en la cola epididimal. Muchos de los fluidos que vienen en el líquido que drena de los túbulos seminíferos, así como algunas proteínas, son reemplazados por otras secreciones en el epitelio epididimal.<sup>13,15</sup>

Durante los 5 a 14 días que dura el paso de los espermatozoides a través del epidídimo se producen cambios adicionales en el fluido que los cubre. Esto provoca cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que lo van haciendo madurar. Los espermatozoides que son liberados del testículo hacia la cabeza del epidídimo no presentan aún la capacidad de fertilizar, sin embargo, los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo ya son fértiles y tienen capacidad de moverse. En la cabeza y cuerpo del epidídimo los espermatozoides no tienen motilidad propia, por lo que su transporte a lo largo del epidídimo depende de la actividad del músculo liso del epidídimo y del movimiento de líquidos provocado por la actividad ciliar del epitelio del conducto epididimal. El epitelio del oviducto en los équidos está compuesto por 3 diferentes tipos celulares: células principales, células apicales y células basales. Las células apicales y principales forman el soporte del tejido, mientras que las basales se

encuentran alrededor de la lámina basal, sin alcanzar el lumen. En este tejido también se encuentran linfocitos y macrófagos que cumplen un papel de protección. Las células basales son más numerosas y largas en la región del cuerpo del epidídimo .<sup>12,16,17,18</sup>

Los cilios de las células epiteliales del epidídimo son proyecciones de la superficie de la membrana celular. Se ha observado mayor presencia de cilios en el cuerpo del epidídimo que en las otras dos regiones.<sup>18</sup>

Los cilios primarios tienen la habilidad de coordinar diferentes señales celulares, funcionando como sensores tanto químicos como mecánicos.<sup>18</sup>

La cola del epidídimo está inervada por neuronas simpáticas asociadas a las células del músculo liso. La cabeza del epidídimo también contiene neuronas simpáticas, pero en menor cantidad y en mayor asociación a la vasculatura epididimal. El proceso mediante el cual los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilización es denominado maduración espermática, la cual depende de la exposición secuencial de los espermatozoides a los fluidos epididimales encontrados en diferentes regiones del epidídimo. Las enzimas y otras proteínas en el fluido modifican la membrana plasmática y otros compuestos del espermatozoide. Para que las diversas regiones del epidídimo secreten la mezcla apropiada de sustancias es importante la estimulación aportada por la testosterona y por otras secreciones que son producidas por estimulación androgénica.<sup>18</sup>

Para saber si un espermatozoide está maduro debe tener capacidad de fertilizar, poseer motilidad progresiva y presentar cambios en la estructura espermática y modificaciones en su metabolismo .<sup>19</sup>

Al producirse la eyaculación los espermatozoides deben pasar del conducto epididimal hacia el deferente impulsados por las contracciones peristálticas del músculo liso de la pared de la cabeza y cuerpo epididimal. En la cola del epidídimo músculo se encuentra normalmente inactivo, a menos que sea estimulado a contraerse.<sup>19</sup>

La fertilidad de los espermatozoides que son eyaculados no se ve afectada por las eyaculaciones frecuentes, ya que el ritmo de transporte espermático a través del epidídimo no está influenciado por la frecuencia de eyaculación; sin embargo el descenso de la fertilidad se puede produce por la disminución de la cantidad de espermatozoides que son eyaculados por debajo del nivel ,requerido para una máxima eficiencia reproductiva.<sup>12,13,15,16,17</sup>

Los espermatozoides son producidos de forma continua y se liberan constantemente, de la misma forma en el que entran al epidídimo, pero el tiempo que permanecen en la cola del epidídimo una vez que llegan allí sí depende de la ocurrencia de la eyaculación.<sup>12,13,15,16,17,18,19</sup>

## ESPERMATOZOIDE EQUINO

La célula espermática equina, como la de cualquier otro mamífero, es una célula altamente especializada que consiste en cabeza, pieza media, pieza principal y

pieza final. El borde posterior de la cabeza espermática y la pieza media están unidos por la región del cuello. La longitud total del espermatozoide es de 60 a 65  $\mu\text{m}$ . La cabeza espermática es aplanada, con dimensiones aproximadas de 6 a 7  $\mu\text{m}$ , la pieza media tiene una longitud de 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente, la sección principal tiene 40  $\mu\text{m}$  de longitud y la sección final tiene de 4 a 5  $\mu\text{m}$ .<sup>10,19</sup>

## **Membrana plasmática**

La membrana plasmática es un componente indispensable para las funciones que desempeñará el espermatozoide en el tracto reproductivo tanto del macho como de la hembra.<sup>15,20,22</sup>

Toda la célula espermática está recubierta por la membrana plasmática, la cual es una doble capa fosfolipídica que además contiene colesterol, que sirve como una sustancia que estabiliza la membrana, proteínas y carbohidratos. Las proteínas son los compuestos con mayor función en la membrana, actuando como canales de iones, poros y receptores, así como componentes de transducción de componentes. Las proteínas que trabajan como receptores de diferentes hormonas son localizadas en la capa exterior de la membrana y del glucocáliz. Las proteínas ocupan el 50% del peso total de la membrana.<sup>15,20,22</sup>

La membrana plasmática del espermatozoide se divide en tres regiones especializadas, acrosomal, ecuatorial y post-acrosomal. La parte posterior del acrosoma es llamada segmento ecuatorial y es el área mediante la cual se une el espermatozoide a la zona pelúcida en la fertilización. Una estructura llamada tapa

o capuchón acrosomal es la parte en donde los segmentos ecuatoriales, marginales y principales se unen. La región postacrosomal de la membrana plasmática es la región entre el margen posterior del segmento ecuatorial del acrosoma y el cuello de la célula espermática. Se le denomina anillo o annulus a la unión del cuello con la pieza media. <sup>15,20,22</sup>

## **Acrosoma**

El acrosoma es una gran vesícula que se sitúa entre la membrana plasmática de la región anterior de la cabeza y la envoltura nuclear. Tiene sus propias membranas, la membrana acrosomal interna que rodea la envoltura nuclear y la membrana acrosomal externa, la cual está cubierta por la membrana plasmática. <sup>15,20,22</sup>

La membrana acrosomal externa y la plasmática se fusionan y abren al exterior durante la reacción acrosomal. <sup>15,20,22</sup>

El acrosoma se deriva del aparato de Golgi de la espermátida. El acrosoma contiene numerosas enzimas hidrolíticas y glucolíticas que son importantes para la fertilización. <sup>8</sup>

## **Núcleo**

El núcleo de la célula espermática consiste en ADN genómico contenido en cromosomas densamente compactados e íntimamente asociados a las proteínas nucleares, denominadas protaminas. Estas son proteínas de bajo peso molecular

y son ricas en residuos de arginina y cisteína. La cromatina de una célula espermática es resistente a la desnaturalización ácida.<sup>8</sup>

## **Flagelo**

La cola espermática o flagelo se divide en cuatro regiones: cuello (zona de conexión), parte media, parte principal y parte final. El flagelo suministra la fuerza motil que es esencial para propulsar al espermatozoide para llegar al sitio de fertilización en el ámpula del oviducto de la hembra.<sup>8</sup>

El cuello o zona de conexión del flagelo contiene estructuras especializadas, específicamente, las columnas segmentadas y el capitulum. El capitulum forma el borde craneal del flagelo en la fosa de implantación, la cual está compuesta de proteínas. En el espermatozoide del garañón la fosa de implantación se encuentra a un lado del centro, lo que produce la unión de la cola en una zona abaxial en un pequeño porcentaje de espermatozoides en el eyaculado. Esta característica no se considera anormal en el equino ya que la mayoría de los garañones contienen un número significativo de espermatozoides con cola abaxial en los eyaculados. Una consecuencia de las colas abaxiales de los espermatozoides es que provocan que “naden” en un patrón circular, lo que en otras especies muchos definen como anormal, es decir, en movimiento no progresivo. En el caso de los garañones, cierto grado de movimiento semi-circular o circular es aceptable por la unión abaxial de la cola.<sup>8</sup>

Las columnas segmentadas sirven como origen de nueve fibras densas longitudinales exteriores que proveen rigidez y resistencia al flagelo. Se extienden hasta la parte final del flagelo en la mayoría de las especies, incluido el caballo. Estas fibras densas rodean el axonema central, que está compuesto de nueve pares de microtúbulos en dobletes. El axonema central es derivado del centriolo distal de la célula. En la región de la parte media las fibras densas externas están envueltas por la vaina mitocondrial, en donde se da el intercambio de compuestos que son importantes para el movimiento del espermatozoide; mientras que en la parte principal las fibras densas están envueltas por la vaina fibrosa. En la parte final del flagelo el patrón microtubular continúa hasta la mitad del flagelo, donde se va perdiendo gradualmente hasta la parte final. Éste patrón microtubular proporciona una contracción coordinada que resulta en un movimiento del flagelo parecido a un látigo.<sup>8,23</sup>

## TRANSPORTE EPIDIDIMAL

En el trayecto de los espermatozoides a través del epidídimo adquieren una capa de glicoproteínas que ayuda a mantener la integridad de la membrana en el tracto reproductor de la hembra.<sup>8</sup>

## OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO

La obtención de espermatozoides del epidídimo es una técnica novedosa que permite obtener material genético cuando un semental sufre un daño severo a los testículos, es sometido a castración o muere prematuramente.<sup>5</sup>

Cuando se realiza una castración los espermatozoides epididimales y del conducto deferente permanecen intactos. La oclusión mecánica del conducto deferente que se realiza al ligar el cordón espermático permite obtener la mayor cantidad posible de espermatozoides, ya que la pérdida de espermatozoides es mínima.<sup>5,8</sup>

Hay dos métodos de obtención de espermatozoides del epidídimo: el lavado retrógrado y el método de flotación.<sup>5</sup>

### **Método de flotación**

Para el método de flotación se colocan la cola del epidídimo y el conducto deferente en un tubo con diluyente de semen u otra solución. Posteriormente se inciden los tejidos en cortes longitudinales múltiples, de 10 a 15 veces en diferentes posiciones. El tejido en el tubo se agita alrededor de 10 minutos.<sup>5</sup>

## **Lavado retrógrado**

Para el método de lavado retrógrado se canula el lumen del conducto deferente y el epidídimo es cortado cerca de la unión con el cuerpo. Los tejidos son suspendidos en un vaso de colección y el lumen es lavado de forma retrógrada con medio de cultivo o con diluyente de congelación.<sup>15,17</sup> Se puede evitar el uso de centrifugación si se utiliza un diluyente de congelación para lavar el lumen del conducto deferente y la cola epididimal.<sup>15</sup>

Se ha observado que los espermatozoides epididimales con o sin epidídimo se pueden mantener hasta por 24 horas a 5 grados centígrados.<sup>17,22,24</sup>

## **EVALUACION DE SEMEN**

El objetivo de la evaluación de semen es determinar los parámetros espermáticos cualitativos y cuantitativos. Los parámetros cuantitativos incluyen la presencia o ausencia de gel, la cantidad de este mismo, la concentración espermática por mililitro y el total de espermatozoides en el eyaculado. Los parámetros cualitativos incluyen el color del semen, el olor, los porcentajes de espermatozoides móviles, la morfología espermática y en algunos estudios la presencia de bacterias.<sup>5,8</sup>

Aunque la evaluación del semen provee información importante, éstos parámetros solamente brindan información indicativa sobre la posible fertilidad del semental.<sup>5,8</sup>

El color del semen normal es blanquecino o grisáceo blanquecino. Un color rojizo o rosado sugiere un problema de hemospermia (presencia de sangre en el

semen), el cual puede ser un factor importante en el descenso de la fertilidad. Los eyaculados de color café sugieren la presencia de sangre no reciente, semen sucio o semen contaminado, mientras que el color amarillento es sugestivo de orina en semen. Cualquiera de estas alteraciones del color del semen indica que la muestra de semen debe ser eliminada o descartada para la inseminación artificial. El olor del semen debe ser un olor neutral y no tener olor pútrido o a orina, ya que de ser así el semen debe ser eliminado.<sup>5,8</sup>

## **Evaluación microscópica**

### *Concentración espermática*

La concentración espermática o densidad representa el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada en ml. La concentración puede medirse mediante un hemocitómetro o cámara de Neubauer, o mediante un espectrofotómetro. La concentración normal en el semen eyaculado es de 100-350x10<sup>6</sup>/ml, dependiendo de los factores estacionales y frecuencia de eyaculaciones. Normalmente la concentración disminuye en 50 a 150x10<sup>6</sup>/ml cuando los sementales son colectados una vez diaria o cada dos días.<sup>5,8</sup>

### *Motilidad espermática*

La motilidad de los espermatozoides es un parámetro funcional que es relativamente sencillo de evaluar. El objetivo de estimar la motilidad espermática es determinar el porcentaje o proporción de espermatozoides móviles. La

evaluación tradicional depende de una estimación subjetiva de lo observado al microscopio, por lo que existe variación entre evaluadores. Sin embargo, actualmente existen métodos computarizados que evalúan el movimiento de cada espermatozoide, por lo que dan resultados precisos.<sup>5,8</sup>

La motilidad es expresada en porcentaje, como motilidad oscilatoria (movimiento circular) o progresiva (movimiento rectilíneo). Los espermatozoides de un garañón fértil deben tener una motilidad progresiva mayor a 60%. La unión abaxial de la pieza media a la cabeza espermática es responsable de un movimiento circular en una muestra de semen.<sup>5,8</sup>

La aglutinación en una muestra es definida como porciones de espermatozoides unidos uno al otro o a una partícula extraña. La aglutinación es debida a que la cabeza se desprende de la cola y sigue en movimiento.<sup>5,8</sup>

### *Morfología espermática*

El objetivo de ésta prueba es identificar las distintas anomalías de un espermatozoide. Se han propuesto 3 clasificaciones para las distintas fallas morfológicas presentes en los espermatozoides: anomalías primarias, anomalías secundarias y anomalías terciarias. Esta división se debe a la causa de la anomalía; las primarias tienen como causa principal errores durante la espermatogénesis, las anomalías secundarias corresponden a un fallo durante la maduración espermática y las anomalías terciarias son provocadas por un mal manejo del semen por parte del evaluador.<sup>10,25</sup>

Generalmente los defectos de origen primario son más severos y se originan durante la espermatogénesis en el epitelio seminífero. Las anomalías secundarias son de una severidad menor que las primarias y ocurren durante el transporte a través del epidídimo y su almacenamiento. Las anomalías terciarias son iatrogénicas porque se producen al momento del manejo de los espermatozoides después de la eyaculación.<sup>10,25</sup>

Para la evaluación morfológica de los espermatozoides se ha propuesto una nomenclatura que divide las anomalías espermáticas en varias categorías: espermatozoides normales, cabezas sueltas, microcefálea, macrocefálea, cabezas dobles, colas enrolladas, gotas citoplasmáticas proximales, gotas citoplasmáticas mediales, gotas citoplasmáticas distales, presencia de células germinales, porcentaje de espermatozoides muertos y porcentaje de espermatozoides viables.<sup>10,25</sup>

## **Pruebas de integridad de membrana plasmática y viabilidad de los espermatozoides**

### *Prueba de solución hipo-osmótica (host)*

El objetivo de la prueba es evaluar la integridad de la membrana plasmática, al poner a prueba la función osmorreguladora de las células. Una evaluación positiva en esta prueba es indicativa de fertilidad de los espermatozoides.<sup>26,27,28,29</sup>

Cuando los espermatozoides son expuestos a condiciones hipo-osmóticas, ocurre una alteración morfológica y su tamaño se incrementa. Durante esta prueba, el espermatozoide al recibir grandes cantidades de agua comienza a “hincharse”, por lo que incrementa su volumen para establecer un equilibrio osmótico entre el fluido en el interior del espermatozoide y el medio extracelular. Este incremento en el volumen se refleja en una expansión esférica de la membrana celular que cubre la cola, forzando al flagelo a enrollarse dentro de la membrana.<sup>26,27,28,29,30,31</sup>

El enrollamiento de la cola comienza en la parte distal de la cola y procede a través de la zona media y la cabeza.<sup>26,27,28,29</sup>

Los mejores resultados se pueden observar en pruebas en las que se utiliza medio mantenido entre 50 y 150 mOsm/L. Un espermatozoide que se encuentre con la cola enrollada se puede considerar normal o intacto. Alguna desventaja que puede presentar esta prueba es la subjetividad, ya que puede cambiar la percepción entre individuos.<sup>26,27,28,29</sup>(FIGURA 4)

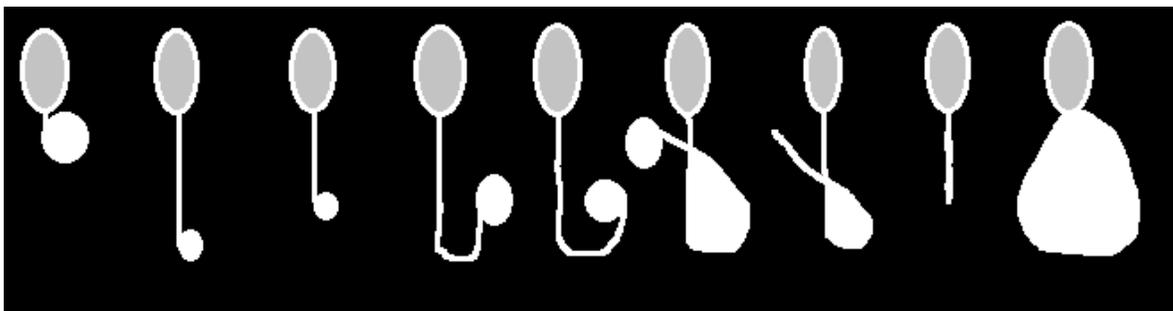


Figura 4.- Esquema mostrando los distintos enrollamientos de cola en el espermatozoide equino, cuando son sujetos a la prueba de HOST.

## **Pruebas de integridad acrosomal**

Para la evaluación del acrosoma se utilizan diferentes estudios, algunos utilizan marcadores fluorescentes, mientras que otros utilizan tinciones especiales como el azul de Coomassie.<sup>5</sup>

### *Prueba de azul de Coomassie*

Como se ha mencionado anteriormente el acrosoma es una estructura derivada del aparato de Golgi. Es un componente vital en la fertilización, por lo que su evaluación es de suma importancia.<sup>32</sup>

La prueba de azul de Coomassie es un método efectivo, además de ser accesible económicamente. Consiste en verificar la integridad del segmento acrosomal en el espermatozoide, lo cual se basa en la capacidad del colorante para unirse a los grupos sulfónicos del acrosoma del espermatozoide.<sup>32</sup>

Una vez teñido será posible observar en el microscopio de contraste de fases los espermatozoides con acrosoma completo o en su caso dañado por exocitosis (reacción acrosomal temprana) o por lesiones producidas durante la criopreservación.<sup>5,32</sup>

## **CRIOPRESERVACIÓN**

La criopreservación es el proceso de congelación mediante el cual los espermatozoides diluidos en un diluyente de congelación adecuado se mantienen durante tiempo indefinido.<sup>4,33</sup>

Durante la la criopreservación se realiza un proceso de difusión de solutos en a través de las membranas del espermatozoide. Los cambios en la estructura e integridad de la membrana que se produzcan como resultado de la criopreservación están íntimamente asociados a la falla en la fertilidad de los espermatozoides.<sup>34</sup>

Los solutos son cualquier sustancia, como sales, azúcares y proteínas disueltas en disolventes, como el agua. La difusión de solutos en una solución se realiza del área de mayor concentración al área de menor concentración para mantener un equilibrio.<sup>34</sup>

Para que la criopreservación se lleve a cabo satisfactoriamente es necesario agregar agentes que protejan al espermatozoide, a estos agentes se les denomina agentes crioprotectores.<sup>34</sup>

En la criopreservación existe un evento de congelación. Las soluciones que se están enfriando al llegar a su punto de congelación comienzan a crear cristales de hielo, mientras que otras sustancias, como sales o azúcares, se mantienen en canales de agua que se forman entre los cristales y no se congelan.<sup>4</sup>

Las células que estén presentes durante la congelación deben estar en los canales de agua para sobrevivir, ya que aquellas que se encuentren atrapadas entre los cristales en formación mueren. Conforme disminuye la temperatura, el agua existente en los canales va congelándose y formando parte de los cristales, lo que provoca que la solución que no aún no se ha congelado se haga hipertónica

debido a que va quedando la misma cantidad de solutos disueltos cada vez en menor cantidad de agua líquida. Al aumentar la concentración de sustancias, en los canales se puede provocar un daño irreversible e incluso la muerte a los espermatozoides.<sup>4</sup>

Si los cambios de temperatura durante la congelación se manejan en forma adecuada la solución que se encuentra en los canales de agua se vitrifica, es decir, no llega a un punto de cristalización. De esta manera y en una temperatura a  $-196^{\circ}\text{C}$  los movimientos de las moléculas continúan y las células pueden mantenerse viables por mucho tiempo.<sup>34</sup>

## **Crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias que añadidas a las células favorecen la criopreservación de las células, en este caso los espermatozoides. Existen dos clases importantes de crioprotectores, aquellos que son impermeables a la membrana celular y aquellos que son permeables.<sup>22</sup>

Los crioprotectores impermeables incluyen azúcares como lactosa, rafinosa y sucrosa, lipoproteínas como las de huevo, leche y suero, además de otras macromoléculas. Todas estas sustancias interactúan con los componentes de la membrana plasmática, ayudando a estabilizar la membrana. El mayor efecto de los crioprotectores es crear un ambiente hiperosmótico que inducirá una deshidratación celular con el objeto de impedir la formación de cristales de hielo en el interior de la célula.<sup>22</sup>

Los crioprotectores penetrantes, como el etilenglicol, glicerol, dimetilsulfoxido, y distintas amidas son generalmente más efectivos que los crioprotectores no penetrantes, ya que éstos afectan irreversiblemente a los espermatozoides. Los crioprotectores penetrantes reemplazan el agua que se encuentra dentro de los espermatozoides, provocando una deshidratación que inhibe la formación de hielo intracelular. Al mismo tiempo incrementan el volumen de los canales entre los cristales extracelulares, aumentando el espacio disponible entre las células y disminuyendo la concentración de sales.<sup>22,35</sup>

Las moléculas de los crioprotectores atraviesan más lento que el agua la membrana plasmática. Esto produce cambios osmóticos temporales que podrían dañar las células. Sin embargo, la resistencia a estos cambios varía entre especies, siendo la especie equina una de las más sensibles a estos cambios.<sup>4,36</sup>

Los crioprotectores, como el etilenglicol, glicerol, o metilformamida contribuyen al momento de la congelación a aumentar el volumen de los canales no congelados entre los cristales de hielo. Estos compuestos al ser permeables a la membrana plasmática provocan efectos osmóticos temporales que se presentan cuando son añadidos al medio o cuando son removidos.<sup>4</sup>

Para la criopreservación de espermatozoides equinos, el primer manejo que se les da después de la colección es la centrifugación. Para este proceso se utiliza un medio de protección celular. Este medio debe ser isosmótico para evitar el daño a los espermatozoides durante la centrifugación. Inmediatamente después

de la centrifugación los espermatozoides deben ser diluidos en un diluyente de criopreservación. Este diluyente debe contener los crioprotectores ideales para el mantenimiento de los espermatozoides. La suspensión de los espermatozoides en este diluyente inicia un proceso de desestabilización osmótica a través de la membrana plasmática del espermatozoide, provocando que se contraiga.<sup>22</sup>

Dependiendo del crioprotector y de la temperatura a la que se añade, el crioprotector entra a la célula y alcanza un equilibrio; posteriormente el agua que entra a la célula más el crioprotector harán que el espermatozoide vuelva a su volumen original.<sup>22</sup>

### *Amidas*

A lo largo de la historia se ha utilizado el glicerol como primer alternativa para la criopreservación de espermatozoides equinos. En 1950 se reportó la primera congelación de espermatozoides; mientras que la primera gestación proveniente de semen congelado fue reportada en 1957. En ambos casos el glicerol fue el crioprotector utilizado para la congelación de semen. En los años 1975 y 1976 **Pace, Sullivan** reportaron que el glicerol tuvo efectos dañinos en la fertilidad del semen congelado.<sup>37,38,39</sup>

En la búsqueda de un crioprotector ideal, que no provoque daño a los espermatozoides durante el proceso de congelación, se han utilizado muchos crioprotectores penetrantes para la congelación de semen. Se ha sugerido que el crioprotector ideal debe tener bajo peso molecular, gran solubilidad en agua y la

mínima toxicidad. Las amidas cumplen con los tres requisitos comparadas con el glicerol.<sup>4,37</sup>

Con el uso de las amidas como agentes crioprotectores en diluyentes de congelación se ha obtenido buena motilidad y mejor preservación de la membrana espermática en comparación con el glicerol, por lo que han demostrado ser una buena alternativa para mantener la motilidad e integridad de los espermatozoides equinos.<sup>4</sup>

### *Lipoproteínas de baja densidad*

Las lipoproteínas de baja densidad son moléculas que pueden proteger la membrana plasmática de los cambios estructurales provocados por factores por cambios exógenos como los que se presentan en la congelación de espermatozoides.<sup>39</sup>

La membrana plasmática sirve como una barrera física que protege al espermatozoide del ambiente externo, además de ser el primer sitio de daño en la congelación y la descongelación. El daño abarca la desestabilización lipídica de la membrana, desde la pérdida de lípidos hasta la peroxidación de lípidos membranales. Todo esto compromete la habilidad de fertilización del espermatozoide.<sup>39</sup>

En este caso en particular, las lipoproteínas protegen a la célula espermática de diferentes formas, como el unirse con los lípidos exógenos del plasma seminal o la fusión con los liposomas de la membrana espermática.<sup>39</sup>

Se han evaluado diluyentes con diferentes concentraciones de lipoproteínas con la finalidad de obtener una mayor crioprotección.<sup>39</sup>

En un estudio realizado por Bravo y Boeta (2010) se valoraron diferentes diluyentes compuestos por yema de huevo y lipoproteínas liofilizadas; ambos fueron evaluados con semen obtenido de eyaculado equino. En dicho estudio se obtuvieron mejores resultados a la evaluación espermática con el diluyente compuesto por lipoproteínas de baja densidad liofilizadas en concentración de 2.5%, por lo se concluyó que puede ser utilizarlo en la criopreservación de semen equino obtenido de eyaculado. Sin embargo, no se ha evaluado este tipo de diluyentes para la criopreservación de espermatozoides obtenidos a partir de la cola del epidídimo.<sup>39,40</sup>

## **HIPÓTESIS**

Los espermatozoides criopreservados a base de amidas y lipoproteínas deberán tener una motilidad progresiva, integridad acrosomal y función osmótica similar o superior a los espermatozoides criopreservados con el diluyente comercial MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los espermatozoides de equino obtenidos del epidídimo y criopreservados con dos diluyentes de congelación, uno elaborado en el departamento de Reproducción FMVZ, UNAM y otro comercial (MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®), comparando la motilidad y viabilidad espermática.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la concentración, motilidad total y motilidad progresiva de los espermatozoides antes y después de su congelación.
- Evaluar la integridad acrosomal y la función osmoregulatoria de los espermatozoides con las pruebas complementarias HOST y tinción Azul de Coomassie.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **OBTENCIÓN DE EPIDÍDIMOS**

Se utilizaron testículos de garañones obtenidos post-mortem en un rastro ubicado en el municipio de Rio Frío, en el Estado de México.

Los garañones que fueron seleccionados en el rastro tenían una condición corporal promedio de 3/5, con edades que oscilaban entre los 3 y los 10 años. La edad de cada animal fue determinada y registrada a partir de la evaluación dental.<sup>41</sup>

Inmediatamente después del sacrificio se obtuvieron los testículos mediante la técnica de orquiectomía cerrada. Posteriormente fueron lavados con solución salina fisiológica al 1% adicionada con 5 ml de gentamicina y atemperada a 34 grados centígrados con la finalidad de eliminar sangre y otras sustancias biológicas que pudieran servir como medio de cultivo para microorganismos.(IMAGEN 1)

Inmediatamente después los testículos fueron colocados en bolsas zip-lock con aproximadamente 15 cm de la solución salina a 34 grados centígrados. Las bolsas se identificaron con el número del semental, edad y condición corporal. Posteriormente las bolsas con los testículos se dejaron a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min con la finalidad de disminuir la temperatura gradualmente.



IMAGEN 1.- Obtención de testículos por orquiectomía tipo cerrada.

## TRANSPORTE

Para su transporte, los testículos atemperados se colocaron en un contenedor de plástico con bolsas de gel en la periferia, los cuales se introdujeron en una hielera de plástico con abundante hielo al interior; lo cual mantuvo a los testículos a una temperatura de 4 grados centígrados, medidos con un termómetro al interior. El tiempo de transporte desde el rastro hasta la llegada al laboratorio era de una hora en promedio. En ese lapso la caja no se abrió.(IMAGEN 2)



IMAGEN 2.- Transporte de testículos a temperatura de 4-5<sup>0</sup>C.

## DISECCIÓN, EVALUACIÓN Y CONGELACIÓN



IMAGEN 3.- Lavado de testículos con Solución salina fisiológica y gentamicina.

En el laboratorio los testículos se retiraron del contenedor y se lavaron nuevamente con solución salina fisiológica antes de prepararlos para la obtención de espermatozoides epididimales.(IMAGEN 3)

La colección de espermatozoides epididimales se realizó de acuerdo a lo reportado por Granemann. El fluido epididimal de ambos testículos se recuperó en un tubo Falcon para su centrifugación. La única modificación realizada a lo dispuesto por Granemann fue de acuerdo al medio de centrifugación implementado. El medio de centrifugación se denomina MMC (Medio Mínimo de Cultivo) agregándolo al fluido obtenido en una concentración 1:1.<sup>39</sup> (Figura 5)

Reactivo	Concentración	100 ml
NaCl	102.03 mM	0.596 g
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM	0.311 g
CaCl <sub>2</sub>	1.71 mM	0.025 g
Lactato de Na	0.25 mM	0.003 g
Piruvato de Na	20 mM	0.220 g
Glucosa	5.56 mM	0.110 g
Rojo Fenol	20 µg/ml	0.02g

TABLA 1.- Composición del Medio Mínimo de Cultivo (MMC). *Rogers y Yanigamichi (1975)*

Antes de la centrifugación se realizó la evaluación macroscópica y microscópica del fluido obtenido junto con el MMC (TABLA 1). Para ello se tiñeron frotis con eosina-nigrosina y se contaron 100 células en cada laminilla. Para la determinación de la concentración se utilizó la cámara de Neubauer.

En seguida se realizó la centrifugación del semen a 600 g x10 min. Después de la centrifugación se separó el MMC de las pastillas obtenidas, con la finalidad de poder prepararlas para el proceso de congelación.<sup>20</sup>

El fluido epididimal obtenido se fraccionó en dos partes iguales para poder utilizar los dos diluyentes de congelación. Un diluyente fue preparado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México llamado PUMA-EXTENDER (TABLA 2). El otro diluyente que se utilizó fue el MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, importado de Alemania.

Para el cálculo del volumen del diluyente de congelación a utilizar se utilizó la siguiente fórmula:

DOSIS TOTAL X 0.85 (15% de pérdidas de centrifugación) ÷ 200 MILLONES DE ESPERMATOZOIDES POR PAJILLA= NÚMERO TOTAL DE PAJILLAS X 0.5 ML (VOLUMEN DE LA PAJILLA)= VOLÚMEN DE DILUYENTE A ADICIONAR

Ejemplo:

Dosis Total=  $\frac{2548.98 \times 10^6}{0.70}$  espermatozoides/ml (Concentración:  $\frac{157.5}{0.70}$  x Motilidad Prog.:  $\frac{0.70}{0.70}$  x Vol. Recuperado: 34ml)

$\frac{2548.98}{0.70} \times 0.85$  (15% de pérdidas de centrifugación)=  $2166.63 \times 10^6$  espermatozoides /ml

$\frac{2166.63}{200}$  (Concentración de espermatozoides por pajilla)= 10.83 pajillas

10.83 pajillas x 0.5 (Volumen por pajilla)= 5.41ml de diluyente a adicionar

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Sacarosa	3.5 g
Glucosa	0.45 g
Leche descremada en polvo	1.2 g
Penicilina Sódica	0.045 g
LDL	3.5 g
Amidas ( Dimetilformamida)	2.5 ml
c. b. p	50 ml

TABLA 2.- Composición del PUMA-EXTENDER

Para la congelación se utilizó un procedimiento de empajillado del semen. El empajillado se realizó manualmente, con el uso de peines marca ARS; se utilizó como sellador alcohol polivinílico. Cada pajilla fue de 0.5 ml, en donde se utilizó una concentración de 200 millones de espermatozoides/ml. (TABLA 3)

Las pajillas se identificaron con fecha de congelación, número, y color correspondiente a cada semental, mientras que los goblets y los portagoblets.se identificaron solamente con el número de semental.

SEMENTAL	# PAJILLAS
1	22
2	9
3	24
4	10
5	17
6	31
7	29
8	25
9	37
10	25

TABLA 3.- Número de pajillas por semental.

## ENFRIAMIENTO

Para reducir progresivamente la temperatura, las pajillas se mantuvieron en refrigeración 20 minutos a 4 grados centígrados.<sup>44</sup>

Posterior a la refrigeración se colocaron las pajillas en una caja de poliestireno; con nitrógeno líquido a la cual se le adaptó una base hecha de plástico y PVC, donde se colocaban las pajillas para exponerlas a vapores de nitrógeno a una altura de 6 centímetros del fondo por 20 minutos. En este momento y antes de

sumergirlas en el nitrógeno líquido deben estar en “punto cristal”, para lo cual se mueven gentilmente provocando un sonido parecido al cristal.

## EVALUACIÓN DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA POST- CONGELACIÓN

### DESCONGELACIÓN

Se realizó la descongelación sumergiendo las pajillas en agua, a una temperatura de 37 grados centígrados durante 30 segundos. En seguida se realizó la evaluación de motilidad, la prueba de solución hipoosmolar (HOST) y la prueba de tinción acrosomal con azul de Coomassie.

### PRUEBA DE HOST

La integridad de la membrana plasmática es de fundamental importancia durante el proceso de fertilización por lo que es importante evaluar su integridad por medio de una prueba de hiposmolaridad, la cual expone a los espermatozoides a diferentes soluciones hipo-osmóticas, en este caso solución PBS (Buffer fosfato salino, por sus siglas en inglés), que realizará la función de mantener las células inmóviles.(TABLA 4)

Se añadió lactosa para crear la solución hiposmolar (50 mosm) además de promover la entrada de líquido para observar la integridad de la membrana. Se agregó 1.80 gramos en 10 ml de agua desionizada. Por último se añadió

paraformaldehido al 4% para poder fijar las células, las cuales se observaron en un microscopio de contraste de fases en aumento de 40x.

COMPUESTO	CANTIDAD
Cloruro de Sodio (NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio ( KCl)	0.2 g
Fosfato de Potasio	0.2 g
Fosfato de sodiodibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.47 g
1 litro de agua desionizada	c.b.p

TABLA 4.- Composición del PBS.

## PRUEBA DE COOMASIE

El objetivo de esta prueba es detectar espermatozoides que presenten una reacción acrosomal temprana o un daño al acrosoma, ocasionando que el acrosoma no se tiña y se asume que la integridad y por tanto la viabilidad del espermatozoide se encuentra comprometida. La tinción con azul de Coomassie es una prueba eficiente y económica comparada con otras técnicas destinadas al mismo fin. Presenta como fundamento la tinción de color azulado del acrosoma, lo

cual se realiza por interacciones electroestáticas de los grupos sulfónicos existentes en la porción rostral de la célula espermática.<sup>32</sup> (TABLA 5)

Esta prueba se unió a la prueba de HOST, con la finalidad de facilitar la evaluación espermática. Las laminillas obtenidas se clasificaron en testigo y prueba. En ambas se contaron 200 células; las colas dobladas que se encontraban en la laminilla testigo se sumaron al total obtenido de la laminilla prueba. Por ende se obtuvieron las 200 células de la laminilla prueba además del total de espermatozoides con colas enrolladas de la laminilla testigo que se sumaron.

Ejemplo:

- Laminilla Testigo: 200 células: 15 células con cola enrollada o doblada
- Laminilla Prueba: 200 células, 63 V+A, 52 M+A, 41 M+A, 44 M-A.
- Total: 200 células contadas en laminilla prueba + 15 células con cola enrollada en laminilla testigo: 215 células contabilizadas

COMPUESTO	CANTIDAD
Azul de Coomassie	0.11 g
Metanol	25 ml
Ácido Acético	5 ml
50 ml de agua desionizada	C.b.p

TABLA 5.- Composición del reactivo Azul de Coomassie

Se clasificaron los espermatozoides de acuerdo a lo encontrado en las pruebas antes mencionadas (FIGURA 5):

- a) V+A.- Espermatozoides con enrollamiento de la cola epididimal y con acrosoma teñido.
- b) V-A.- Espermatozoides con enrollamiento de la cola epididimal pero con daño acrosomal, sin tinción.
- c) M+A.- Espermatozoides sin enrollamiento pero con tinción en el acrosoma.

d) M-A.- Espermatozoides sin enrollamiento de cola epididimal y sin tinción en el acrosoma.



FIGURA 5.- Clasificación de los espermatozoides en la prueba de HOS y tinción azul de COOMASSIE, a) V+A, b) V-A, c) M+A, d) M-A.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros fueron analizados con la prueba de muestra de t pareadas. Se realizó la comparación de medias entre variables (Concentración espermática, Motilidad a la precongelación, Motilidad a la descongelación, HOST+Coomassie) para establecer una diferencia estadística en ambos diluyentes de congelación. Las diferencias entre diluyentes fueron consideradas significantes menores a  $P < 0.5$ . Se utilizó este programa en el departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA

TABLA 6. Porcentaje de anomalías en los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de cada semental.

SEMENTALES	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA											
	CS%	MC%	MaC%	CD%	CoD%	CoE%	GP%	GM%	GD%	CG%	M%	V%
1	1	-	-	-	9	-	4	-	1	-	6	79
2	2	2	-	14	3	2	-	2	3	-	13	59
3	-	1	-	1	3	1	7	1	3	-	8	75
4	3	3	-	-	7	3	-	-	1	-	15	68
5	5	-	-	-	-	1	2	-	8	-	14	70
6	4	-	-	-	3	1	-	-	2	-	5	85
7	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	17	72
8	7	-	-	-	5	-	5	-	1	-	8	74
9	4	-	-	-	4	-	1	1	-	-	20	70
10	4	-	-	-	18	-	2	1	5	-	7	63
PROMEDIOS	3	0.6	0	1.5	6.3	0.8	2.1	0.5	2.4	0	11.3	71.5

**CS.-** Cabezas sueltas, **MC.-** Microcefálea, **MaC.-** Macrocefálea, **CD.-** Cabezas dobles, **CoD.-** Colas dobladas, **CoE.-** Colas enrolladas, **GP.-** Gotas proximales, **GM.-** Gotas mediales, **GD.-** Gotas distales, **CG.-** Células germinales, **M.-** Muertos, **V.-** Vivos

En la TABLA 6 se representan todos los resultados promedios obtenidos en porcentajes totales de la evaluación de la morfología de las muestras, los cuales se obtuvieron antes de la criopreservación

El promedio de cabezas sueltas fue de 3%, sin embargo sólo dos sementales fueron los que no tuvieron ésta anormalidad espermática.

La microcefálea se presentó en tres de los diez sementales. En cambio no se encontró macrocefálea en ninguno de los sementales evaluados.

En sólo dos sementales se identificaron espermatozoides con cabezas dobles. Las colas dobladas fue el parámetro que obtuvo mayores promedios, ya que este se presentó con mayor frecuencia en los sementales. Sin embargo, sólo uno de los sementales mostró la ausencia de ésta anormalidad espermática. Únicamente la mitad de los sementales evaluados tuvieron espermatozoides con colas enrolladas.

Se presentaron seis sementales que presentaron gota citoplasmática proximal en alguno de sus espermatozoides evaluados. No obstante fue uno de los criterios evaluados con mayor promedio. En cuatro de diez sementales evaluados presentaron gota citoplasmática medial. Otro rubro de gran importancia estadística fueron los espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales, ya que sólo dos sementales exentaron este rubro.

Además de los espermatozoides con macrocefálea, la presencia de células germinales fue nula en todos los sementales evaluados.

El criterio de mortalidad espermática fue uno de los más altos en promedio. Sin embargo sólo tres sementales sobrepasaron el 15% de espermatozoides muertos por muestra de cada semental.

## CONCENTRACIÓN, MOTILIDAD TOTAL Y MOTILIDAD PROGRESIVA ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN.

TABLA 7.- Resultados a la precongelación y descongelación de espermatozoides

SEMENTALES	PRECONGELACIÓN		DESCONGELACIÓN		
	CONCENTRACIÓN TOTAL (x10 <sup>9</sup> /ml)	MOTILIDAD TOTAL (%)	MOTILIDAD PROGRESIVA (%)	DILUYENTE DE CONGELACIÓN	MOTILIDAD PROGRESIVA (%)
1	4.870	90	85	a	40
				b	20
2	4.636	95	80	a	40
				b	40
3	8.330	95	90	a	40
				b	30
4	5.355	85	70	a	50
				b	50
5	8.137	85	70	a	30
				b	10
6	11.300	80	75	a	40
				b	30
7	10.800	90	85	a	50
				b	30
8	8.700	95	90	a	50
				b	50
9	15.700	90	80	a	40
				b	45
10	11.640	85	80	a	30
				b	20
PROMEDIOS	8.9448	89	80.5		a:41 b:32.5

a)PUMA EXTENDER, b) MINITUBE EQUIPRO CRYOGUARD®

De los resultados obtenidos en la concentración espermática antes de la congelación de los 10 sementales sólo 6 obtuvieron resultados mayores a la media que fue de  $8.9 \pm 3.5 \times 10^9$  espermatozoides/ml.(TABLA 7).

El promedio de motilidad total fue de 89%. Siendo sólo un semental el único que obtuvo el peor registro en este rubro con 80%.

La motilidad progresiva del semen antes del proceso de congelación fue del  $80.5 \pm 2.29$  ; una vez sometido a la criopreservación y descongelación con el diluyente PUMA-EXTENDER, esta fue del  $41 \pm 2.33$  mientras que con el comercial (MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®) fue del  $32.5 \pm 4.29$ .

EVALUACIÓN LA INTEGRIDAD ACROSOMAL Y LA FUNCIÓN OSMOREGULATORIA POR LAS PRUEBAS DE HOST Y AZUL DE COOMASSIE

TABLA 8.- RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DE HOS Y COOMASSIE

SEMENTALES	DILUYENTE DE CONGELACIÓN	HOS+COOMASSIE (%)							
		V + A	V - A	M + A	M - A				
1	a	25	4.09	64.09	6.81				
	b	27.35	4.71	52.35	15.56				
2	a	67.6	29.1	2.34	0.93				
	b	25.82	4.22	66.66	3.28				
3	a	35.9	1.36	59.54	3.18				
	b	33.64	2.76	58.06	5.52				
4	a	39.02	0	58.53	2.43				
	b	38.86	1.31	57.64	2.18				
5	a	24.42	0.46	73.73	1.38				
	b	22.6	2.2	69.2	6				
6	a	53.94	0	45.61	0.43				
	b	17.88	0	57.79	24.31				
7	a	46.29	0.46	53.24	0				
	b	33.81	0	66.7	0.48				
8	a	35.54	0.47	62.08	1.85				
	b	30.33	0.47	69.19	0				
9	a	34.74	0.46	63.84	0.93				
	b	38.83	0	60.67	0.48				
10	a	27.44	0	71.16	1.39				
	b	22.92	0	75.12	1.95				
PROMEDIOS		a:38.98	b:29.20	a:3.64	b:1.56	a:55.41	b:63.33	a:1.93	b:5.9

a)PUMA EXTENDER, b) MINITUBE EQUIPRO CRYOGUARD®

En el presente trabajo se reunieron las técnicas de HOST y la tinción Azul de Coomassie en una sola evaluación para poder evaluar con mayor precisión a los espermatozoides que tuvieran daño en la membrana plasmática así como reacción acrosomal temprana que pudieran comprometer la integridad y eficiencia del espermatozoide.

Se evaluaron los diluyentes de congelación con espermatozoides obtenidos de epidídimo equino a la pre y post-congelación (TABLA 8).

En la clasificación de vivos con acrosoma (V+A) se obtuvo un promedio de 38.98% con el diluyente PUMA-EXTENDER de la FMVZ-UNAM mayor al presentado por el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, el cual fue de 29.20%. El semental 2 fue el que tuvo el mejor resultado con el diluyente PUMA-EXTENDER, obteniendo un promedio de 67.6%. Con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD® el semental 4 tuvo el mejor resultado con 38.86%.

El promedio obtenido de vivos sin acrosoma (V-A) con el PUMA-EXTENDER fue de 3.64%, mientras que el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD® obtuvo un 1.56%. El semental 2 tuvo un mayor resultado a comparación de los demás sementales con el diluyente PUMA-EXTENDER, el cual fue de 29.1%. El diluyente comercial MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD® tuvo su mejor resultado en este rubro con el semental 1, el cual fue de 4.71%.

La clasificación de muertos con acrosoma (M+A) tuvo sus mejores resultados con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, el cual obtuvo un promedio de

55.41%, mientras que el diluyente PUMA-EXTENDER obtuvo un promedio de 63.33%. El semental 10 tuvo un mejor promedio con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, el cual fue 75.12. Sin embargo el diluyente PUMA-EXTENDER presentó con el semental 5 un 73.73%.

El promedio de espermatozoides muertos sin acrosoma fue mayor con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD® con un promedio de 5.9%; el diluyente PUMA-EXTENDER obtuvo un promedio de 1.93%. El mayor promedio de este rubro lo obtuvo el semental 6 con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, con un 24.31%. El semental 1 obtuvo 6.81% de promedio con el diluyente PUMA-EXTENDER, el cual fue el mayor con este diluyente de congelación.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó la prueba de “t” pareadas, comparando los resultados obtenidos entre los diluyentes de congelación. Se consideraron representativas aquellas muestras de comparaciones cuya significancia fuera  $P < 0.5$ . (TABLA 9)

La comparación entre la motilidad a la descongelación entre ambos diluyentes tuvo como resultado 0.019, estadísticamente significativa ( $P < 0.5$ ).

En la comparación que se realizó entre motilidad a la precongelación y motilidad a la descongelación entre ambos diluyentes también mostró resultados significativos ( $P < 0.5$ ).

Sin embargo, en las comparaciones restantes los resultados no mostraron una diferencia estadística, por lo que no resultaron significativos.

TABLA 9.- Resultados de la Prueba de “t” pareadas.

VARIABLES COMPARADAS	Promedio	Desviación Estándar	Significancia
Motilidad Precongelación	80.5	7.246	
Motilidad Descongelación PUMA	41	7.379	0.000
Motilidad Precongelación	80.5	7.246	
Motilidad Descongelación CRYO	32.5	13.591	0.000
Motilidad descongelación PUMA	41	7.379	
Motilidad Descongelación CRYO	32.5	13.591	0.019
V+A PUMA	85.6	30.288	
V+A CRYO	62.8	15.39	0.07
V-A PUMA	7.8	19.234	
V-A CRYO	2.9	3.985	0.385
M+A PUMA	122.8	45.136	
M+A CRYO	138.1	19.964	0.32
M-A PUMA	4.3	4.322	
M-A CRYO	11.6	17.602	0.205
TOTAL PUMA	220.5	10.363	
TOTAL CRYO	215.4	10.384	0.083

V+A.- Vivos con acrosoma, V-A.- Vivos sin acrosoma, M+A.- Muertos con acrosoma, M-A.- Muertos sin acrosoma

## DISCUSIÓN

El proceso de obtención de espermatozoides de origen epididimal en esta investigación fue realizado bajo los criterios de la técnica de lavado retrógrado. (Granemann, 2006) (Bruemmer, 2011).

El tiempo, como la temperatura a la que son transportados los testículos pueden afectar la recuperación de espermatozoides viables; en el presente trabajo se mantuvieron en refrigeración durante aproximadamente 1 hora, sin embargo Monteiro et., al (2013) menciona que se pueden preservar hasta por 24 horas a una temperatura de 4-5<sup>0</sup>C.

Los resultados obtenidos en morfología espermática coinciden con lo reportado por Harald (2009) en el que menciona que en una muestra se pueden encontrar hasta un 30% de espermatozoides morfológicamente anormales.

La concentración espermática fue otro parámetro evaluado. En la presente investigación se obtuvo un promedio  $8.9 \pm 3.5 \times 10^9$  espermatozoides por par de epidídimos, el cual fue menor, de acuerdo a lo reportado por Amann et al.,(1979) en el cual menciona que en ambos epidídimos de un garrón sexualmente activo debe contener  $54 \times 10^9$  espermatozoides. Sin embargo en otro estudio realizado por Guimaraes et al.,(2012) obtuvieron una concentración de  $8.520 \pm 1.050 \times 10^9$  espermatozoides obtenidos de la cola epididimal después de la orquitectomía y  $8.036 \pm 1.289 \times 10^9$  espermatozoides después de 24 horas a 4 grados centígrados. La baja concentración obtenida en este estudio pudo deberse quizá a la técnica

de lavado para obtener los espermatozoides, porque en muchos estudios incluyen la maceración de la cola del epidídimo para aumentar la concentración.

El promedio en la motilidad progresiva de ambos epidídimos de los diez sementales a la pre-congelación adicionados con el MMC obtuvo un 80.5%, el cual está un poco más elevado a lo obtenido por Neuhauser et al., (2013), en el que se obtuvo una motilidad progresiva de 76.29% utilizando espermatozoides obtenidos bajo los mismos criterios de obtención y evaluación en este trabajo.

En la motilidad progresiva a la descongelación en el presente trabajo se obtuvieron porcentajes promedio de 41% con el PUMA-EXTENDER y 32.5% con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, los cuales se encuentran por debajo a lo descrito por Alvarenga et al., (2005) el cual, obtuvo porcentajes de 64 al 84% en espermatozoides obtenidos de eyaculado.

Se utilizaron dos técnicas de evaluación espermática: la prueba de solución hiposmótica (HOST) y tinción acrosomal con azul de Coomassie. En este trabajo se unieron ambas técnicas para simplificar y estandarizar los porcentajes de espermatozoides obtenidos utilizando el PUMA-EXTENDER y MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®, se obtuvieron porcentajes de 38.98 y 29.20% de espermatozoides vivos con acrosoma intacto respectivamente. Lo anterior descrito supera a lo reportado por Bravo (2010), el cual obtuvo con eyaculados equinos, utilizando lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) como agente crioprotector, un porcentaje de  $19.68 \pm 14.36$ ; sin embargo en dicha

investigación utilizaron un porcentaje de inclusión más baja de lipoproteínas, pudiendo afectar en la viabilidad.

## **CONCLUSION**

En la presente investigación se demostró bajo las pruebas de HOST y tinción acrosomal con azul de Coomassie la practicidad en la evaluación de espermatozoides equinos; además se comprobó la efectividad en la crioprotección espermática a base de amidas y lipoproteínas de baja densidad liofilizadas en el diluyente PUMA-EXTENDER comparado con el diluyente MINITUBE EQUIPRO-CRYOGUARD®. Además se ratificó la eficiencia en la obtención de espermatozoides epididimales por medio del lavado retrógrado al mostrar buenas concentraciones en la mayoría de los sementales.

Sin embargo aún queda mucho por investigar utilizando espermatozoides obtenidos de epidídimo; por consiguiente este estudio se presenta como base para posteriores investigaciones para concluir con las pruebas de fertilidad de espermatozoides obtenidos bajo este procedimiento en la práctica equina.

## REFERENCIAS

- 1) Pamornsakda T, Pojprasath T, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm, *Theriogenology*, 2011,63; 90-95
- 2) Bruemmer J.E, Collection and freezing of epididymal stallion sperm, *Vet. Clin. Equine*,2006; 22; 677-682
- 3) Robaire B., Hinton B., Orgebin-Crist M., The epididymis, En: Knobill, Neills, *Physiology of Reproduction: Elsevier*, 2006;1071-1148
- 4) Peña F.J., Macías-García B., Samper J.C., Aparicio L.M., Tapia J.A., Ortega-Ferrusola C., Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols, *Theriogenology*,2011; 76:1117-1186
- 5) Mckinnon O.A, Squires L.E, Vaala W.E, Varner D.D., *Equine Reproduction*, 2da. Edición. Reino Unido.Wiley-Blackwell.2011
- 6) Fioratti E.G., Melo C.M., Villaverde A.I.S.B, Martin I., Felicio G.B, Ferreira H.N., Oliveira J.V., Alvarenga M. A., Papa F.O., Correlation of testicular volume and weight with sperm recovery from stallion epididymis, *Animal Reproduction Science*,2008; 20-21
- 7) Pozor M.A, Evaluation of testicular vasculature in stallions, *Clinical Techniques in Equine Practice*,2007; 6:271-277
- 8) Samper J. C, *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2da Edición. Estados Unidos. Saunders. 2009

- 9) Brito F.C.L, Evaluation of stallion sperm morphology, *Clinical Techniques in Equine Practice*,2007; 6:249-264
- 10) Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Battogiannis D., Giannakis D., Pardalidis N., Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*,2008; 109: 323-330
- 11) França R.L., Avelar F.G., Almeida F.L.F., Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs, *Theriogenology*, 2005;63:300-318
- 12) Johnson L., Blanchard T.L., Varner D.D., Scruthfield W.L., Factors affecting spermatogenesis in the stallion, *Theriogenology*,1997; 48:1199-1216
- 13) Sostaric E., Aalberts M., Gadella B.M., Stout T.A.E., The roles of the epididymis and proteasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm, *Animal Reproduction Science*, 2008; 107:237:248
- 14) Roser F.J., Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems, *Animal Reproduction Science*,2008; 107:179-196
- 15)Hernández P.J.E., Fernández R.F., Rodríguez S.J.L., Soto M.Y.G., Verona J.E.H., García R.A.D., Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Revista Salud Animal*,2012; 2:84-88
- 16)Monteiro G.A., Guasti N.P., Rocha S.A., Martin I., Sancler-silva R.Y.F., Dell'Aqua F.P.C., Dell'Aqua J. A., Papa F.O., Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters and

- freezability of epididymal sperm, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2013;33:169-173
- 17) Arrighi S., Primary cilia in the basal cells of equine epididymis: A serendipitous finding, *Tissue and Cell*, 2013; 45:140-144
- 18) Gadella B.M., Luna C., Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface, *Theriogenology*; 2014,81:74-84
- 19) Gadella B.M., Rathi R., Browers J.F.H.M, Stout T.A.E., Colenbrander B., Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, 2001; 68:249-265
- 20) Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E.G., Dell'Aqua J.A., Zahn F.S., Alvarenga M.A., Freezing of stallion epididymal sperm, *Animal Reproduction Science*, 2008; 107:293-300
- 21) Aurich C., Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 2005; 89:65-75
- 22) Schober D., Aurich C., Nohl H., Gille L., Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa, *Theriogenology*, 2007; 68:745-754
- 23) Monteiro G.A., Papa F.O., Zahn F.S., Dell'Aqua J.A., Melo C.M., Mazeiro R.R.D., Avanzi B.R., Alvarenga M.A., Guasti P.N., Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm, *Animal Reproduction Science*, 2011; 127:197-201
- 24) Varner D.D., Developments in stallion semen evaluation, *Theriogenology*, 2008; 7: 448-462

- 25) Nield D., Chaves G., Flores M., Mora N., Beconi M., Aguero A., Hyposmotic test in equine spermatozoa, *Theriogenology*, 1998; 51:721-727
- 26) Nie G.J., Wenzel J.G.W., Adaptation of the hypotonic swelling test to assess functional integrity of stallions spermatozoal plasma membranes, *Theriogenology*, 2000; 55:1005-1018
- 27) Eshleman K.C., Pinto C.R.F., Simplifying the determination of sperm membrane integrity in stallions with the hypotonic swelling test, *Animal Reproduction Science*, 2010; 1215:5203-5204
- 28) Pinto C.R.F., Kozink D.M., Simplified hypotonic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa, *Animal Reproduction Science*, 2008; 104:450-455
- 29) Correa J.R., Zavos P.M., The hypotonic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane, *Theriogenology*, 1994; 42:351-360
- 30) Caiza de la Cueva F.I., Rigau T., Bonet S., Muró J., Briz M., Rodríguez-Gil J.E., Subjecting horse spermatozoa to hypotonic incubation: Effects of ouabain, *Theriogenology*, 1996; 47:765-784
- 31) Caiza de la Cueva F.I., Pujol M.R., Rigau T., Bonet S., Miró J., Briz M., Rodríguez-Gil J.E., Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success, *Theriogenology*, 1997; 48:947-968

- 32) Brum A. M., Thomas A. D., Sabeur K., Ball B. A., Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa, *AJVR*, 2005; 67: 358-362
- 33) Thomas A.D., Meyers S.A., Ball B.A., Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation, *Theriogenology*, 2006; 65:1531-1550
- 34) Moore A.I., Squires E.L., Bruemmer J.E., Graham J.K., Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2006; 5:215-218
- 35) Brum A.M., Sabeur K., Ball B.A., Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation, *Theriogenology*, 2008; 69:1041-1055
- 36) Alvarenga M.A., Papa F.O., Landim-Alvarenga F.C., Medeiros A.S.L., Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review, *Animal Reproduction Science*, 2005; 89:105-113
- 37) Macías García B., Morrell J.M., Ortega-Ferrusola C., González-Fernández L., Tapia J.A., Rodríguez-Martínez H., Peña F., Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen, *Animal Reproduction Science*, 2009; 114:193-202
- 38) Pace M.M., Sullivan J.J., Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen, *Journal of Reproduction*, 1975; 23:115-121

- 39)Moreno D., Bencharf D., Amirat-Briand L., Neira A., Destrumelle S., Tainturner D., Preliminary results: The advantages of low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen, *Journal of Equine Veterinary Science*,2011; 33:1068-1075
- 40)Granemann LC. Avialacao comparative do semen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo (Tesis de maestria) Curitiba Brasil: 2006 Universidade Federal do Paraná.
- 41)Carroll C.L., Huntington P. J., Body condition scoring and weight estimation of horses, *Equine Veterinary Journal*, 1988;20:41-45
- 42)Bravo F.L, Efecto de las lipoproteínas de baja densidad liofilizadas sobre la integridad del acrosoma y la membrana espermática equina durante la congelación (tesis de licenciatura). México D,F. 2010
- 43)Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E. G., Dell'Aqua J.A., Zahn F.S., Alvarenga M.A., Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 2008; 107: 293- 301
- 44)Weiss R.R., Muradas P.R., Granemann L.C., Meira C., Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions, *Animal Reproduction Science*,2008; 3632:1-59
- 45)Guimaraes T., Lopes G., Guimaraes T., Lopes G., Ferreira P., Leal I., Rocha A., Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen-thawed sperm cells, *Animal Reproduction Science*, 2012;136:85-89

- 46) Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J., Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2013; 1-8
- 47) Gamboa S., Rodrigues A.S., Henriques L., Batista C., Ramalho-Santos J., Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa, *Theriogenology*, 2010; 73:950-958
- 48) Amann R.P., Thompson D.L. Jr, Squires EL., Pickett B. W., Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal reserves in stallions. *Journal of Reproduction Fertility* 1979; 27:1-6.
- 49) Rogers BJ, Yanagimachi R. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose; the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 1975; 13:568-575
- 50) Álvarez C., Gil L., González N., Olaciregui M., Luño V., Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® Extender, 2014; 69:144-148
- 51) Olaciregui M., Gil., Montón A., Luño V., Jerez R. A., Martí J.L., Cryopreservation of epididymal stallion sperm, *Criobiology*, 2014; 68:91-95