

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE EQUINO MEDIANTE UNA
PRUEBA DE RESISTENCIA OSMOTICA**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

ALISTAIR GENESIS GONZALEZ GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

ASESORES

Dr. RAFAEL VILLA ANGULO

Dra. OLGA MARITZA MANRIQUEZ NÚÑEZ

Dr. CARLOS VILLA ANGULO

Dr. RICARDO MORALES CARBAJAL

MEXICALI, B.C., MEXICO

ABRIL 2018

EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE EQUINO MEDIANTE UNA PRUEBA DE RESISTENCIA OSMOTICA. Tesis presentada por Alistair Génesis González González como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra

Director de tesis

Dr. Rafael Villa Angulo

Co-director de tesis

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez

Asesor

Dr. Carlos Villa Angulo

Asesor

Dr. Ricardo Morales Carbajal

Asesor

Mexicali, Baja California, México

Abril 2018

DEDICATORIA.

A mi madre María de Fátima González Urbalejo, por su invaluable e incondicional apoyo durante mi trayectoria en esta nueva empresa de estudios de maestría.

A mi abuelo Amado Grijalva Quezada, por su paciencia y su enseñanza en los tópicos de la vida que mucho me sirvieron para caminar con pie firme durante mi formación.

A Dios por su infinita paciencia y amor a la vida.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT

Por el apoyo brindado durante el trayecto de ésta investigación, con la cual se cumple a la letra su visión de impulsar y fortalecer el desarrollo científico y la modernización tecnológica en México.

GRACIAS por su apoyo invaluable para abrir camino como investigador en áreas tan poco profundizadas pero que son de gran importancia en el mundo de la Reproducción equina, pero sobre todo para mi persona y mi deseo de engrandecer y proyectar a mi alma mater.

A LA UABC, por cobijarme en todo el proceso de incubación desde ser un egresado de bachillerato hasta convertirme en el investigador de hoy: GRACIAS.

Por alimentar mi espíritu de conocimiento y proveerme directrices que me llevaron a la búsqueda de información. Gracias... POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE.

RANCHO MI HACIENDA, mi más sincero reconocimiento a su amabilidad, apertura, pero sobre todo: disposición. GRACIAS por la confianza depositada al entregarnos su patrimonio equino al servicio de la ciencia en aras del desarrollo y la excelencia reproductiva en nuestro país.

A LOS PROPIETARIOS DE CABALLOS que han colaborado a enriquecer mi práctica médica y científica. GRACIAS por la confianza y los comentarios con que han evaluado mis trabajos.

COMITÉ DE EVALUACIÓN, sin ustedes mi trabajo no tendría ésta dirección tan asertiva, con la cual pretendo poner en alto el nombre de mi ALMA MATER. Ustedes son el extracto, lo más selectivo de ella, GRACIAS POR CONFIAR EN MI, GRACIAS POR SER MIS COPILOTOS DE ESTE VIAJE.

A TODOS LOS MAESTROS QUE HE TENIDO EN EL TRANCURSO DE MI VIDA ESTUDIANTIL...GRACIAS.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
RECOLECCIÓN DE SEMEN EQUINO.....	8
CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO EQUINO.....	12
-DESARROLLO DEL ESPERMATOZOIDE EQUINO.....	12
-ESPERMATOGÉNESIS.....	13
-REGULACION DE LA ESPERMATOGÉNESIS POR APOPTOSIS.....	14
-MADURACION ESPERMATICA EN EL EPIDÍDIMO.....	14
-ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE EQUINO.....	15
FISIOLOGIA ESPERMÁTICA.....	17
-MOTILIDAD ESPERMÁTICA.....	17
-CAPACITACIÓN.....	18
-REACCION ACROSOMICA.....	19
-COMPORTAMIENTO OSMÓTICO CELULAR.....	19
-PRESIÓN OSMÓTICA.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	24
-DISCUSIÓN.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMEN

La integridad de la membrana espermática, ha sido utilizada para valorar la calidad seminal, por ser responsables de hacer efectivas las interacciones entre célula, tanto desde el punto de vista estructural como del funcional. La prueba de resistencia osmótica (ORT) evalúa la sensibilidad de la membranas a cambios repentinos en la osmolaridad del medio y por tanto su salud, pudiendo predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal. Con el objetivo de determinar si el ORT puede complementar la evaluación seminal y predecir la fertilidad in vivo en garañones, se condujo este experimento donde fueron colectados seriadamente los eyaculados de ocho garañones y posteriormente se realizaron el ORT a cada muestra seminal fresca. Siendo evaluadas en dos lotes, cuatro de ellos ubicados en la zona costa y los otros cuatro ubicados en el valle de Mexicali, estos muestreos se realizaron repetitivamente de Enero a Junio, obteniendo las medias de los mismos, para el análisis se utilizó una prueba de análisis comparación de medias y se contrastaron mediante prueba T, utilizando el programa estadístico R i386 versión 3.4.3. Y se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos en la prueba de HOST en los diferentes garañones ni por ubicación ni por época del año. ($r=0.551$, 18.52 ± 9.11 para el grupo A y 17.64 ± 8.054 para el grupo B respectivamente).

PALABRAS CLAVES: resistencia osmótica, equino, esperma, membrana celular.

ABSTRACT

The integrity of the sperm membrane has been used to evaluate the seminal quality, as well as the interactions between cells, both from a structural and functional point of view. The osmotic resistance test (ORT) evaluates the sensitivity of the membranes to sudden changes in the osmolarity of the medium and therefore its health, being able to predict the fertilizing capacity of a seminal sample. With the objective of determining if the ORT can complement the seminal evaluation and predict the in vivo fertility in stallions, this process was conducted were found the severely collected ejaculates of eight stallions and then the ORT was made to each fresh seminal sample. Being evaluated in two lots, four of them located in the coastal zone and the other four located in the Mexicali valley, these are summarized repeatedly from January to June, obtaining the means of the same, for the analysis an analysis test is used comparative of means and contrasted by means of test T, using the statistical program R i386 version 3.4.3. And it was found that there is no significant statistically significant difference in the results obtained in the HOST test in the different garages neither by location nor by time of year. ($r = 0.551$, media group A 18.520, media group B 17.645, standard deviation group A = 9.1162, B = 8.0543).

KEYWORDS: osmotic resistance, equine, sperm, cell membrane.

INTRODUCCION

Las herramientas y procesos tecnológicos que el hombre aplica de manera directa o indirecta a la reproducción, en este caso animal, se conocen como biotecnologías reproductivas, o técnicas de reproducción asistida (Lossino, 2007). Los reportes anecdóticos de estas herramientas en equinos, son antiguos (siglo XVI), pero el verdadero auge ocurrió durante la segunda mitad del siglo pasado con la expansión de la inseminación artificial (IA), y la transferencia de embriones, ambas de gran impacto sobre los sistemas productivos (Lossino 2007). La inseminación artificial se ha utilizado con éxito en equinos. Al parecer, la primera descripción de IA fue en 1322, cuando el semen de un semental árabe se recuperó de la vagina de una yegua recién apareada, fue transportado en leche de camella, y depositado en la vagina de otra yegua para producir un potro (Allen, 2005). Durante la criopreservación, los espermatozoides sufren cambios físicos y químicos que pueden ser dañinos, como: deshidratación parcial, penetración del crioprotector a las células, reorganización de proteínas y lípidos de membrana, exposición a elevadas concentraciones de sales y a cristales de hielo intra y extracelulares (Aurich, 2005). Estos cambios pueden producir daños oxidativo y osmótico al espermatozoide. Las bajas temperaturas pueden producir daño oxidativo en la membrana, las proteínas o el ADN de los espermatozoides y el estrés osmótico puede dañar la membrana y alterar el metabolismo espermático. Para minimizar el estrés osmótico durante la criopreservación se ha utilizado la dilución de crioprotectores y se han evaluado crioprotectores alternativos al glicerol (Baumber, 2005). También se ha tratado de aumentar la estabilidad de la membrana incorporando ciclodextrinas cargadas con colesterol en los diluyentes para criopreservar (Oliveira, 2009). El Test Hipoosmótico es un indicador más apropiado que la tinción supravital. (Tamuli, 1992). Se prevé que la industria equina utilizara semen refrigerado y congelado en una amplia escala solo cuando la fertilidad del mismo sea mejorada y demostrada. (Alvarenga, 2005). Por lo anterior el objetivo de este trabajo es la evaluación del semen fresco mediante una prueba de resistencia de la membrana espermática para conocer el comportamiento osmótico de los espermios de los garañones cuartos de milla en las diferentes estaciones del año ubicados en la zona costa y valle del estado de Baja California.

JUSTIFICACIÓN

La inseminación exitosa no se puede dar si la calidad espermática no es la adecuada aun cuando se utilice semen fresco y más aún cuando el semen ha sido congelado. Otros aspectos como la valoración de la calidad espermática de distintos garañones de la misma raza en condiciones similares en la misma época del año no ha sido valorada y menos aún en nuestro entorno, aspecto que motiva y justifica el presente trabajo para demostrar la estación adecuada para la recolección de semen de caballos en Baja California (González, V. V y Núñez R. A. 2015).

REVISION DE LITERATURA

Acerca del tema de la reproducción en equinos, es poca la investigación realizada, sin embargo si existe aunque con sus limitantes tanto de parte de los propietarios de los caballos, como la limitante económica. En 1997, (Malmgren, 1997), en Suecia, Se realizaron 2 recolecciones de semen de un garañón, con diferencia de una hora entre los eyaculados, y procesándolo llevando a cabo las pruebas de evaluación tradicionales como lo son: volumen del eyaculado, concentración espermática, morfología espermática, pH seminal, longevidad de la motilidad espermática y estatus bacteriológico. Además se incluyeron unas pruebas no convencionales como el uso de tinciones fluorescentes como marcadores de integridad de membrana celular, prueba de unión de ovocitos espermáticos y prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST). Donde se hizo énfasis en la motilidad de los espermatozoides y la morfología de los espermatozoides, pero además, algunas pruebas funcionales y la prueba de HOST. Concluyendo que la evaluación de las características del semen proporciona una gran cantidad de información. Sin embargo, a pesar de que se sabe que varias características del semen afectan la fertilidad, ninguna característica única ha demostrado ser prometedora en evaluaciones recientes. Sin embargo, el objetivo de predecir con precisión la capacidad de fertilización a través de la evaluación de laboratorio de la calidad del semen aún no se ha logrado. De igual manera en el mismo año se realizó un estudio de una prueba hipoosmótica en espermatozoides equinos, (Neild et al., 1997) en donde evaluaron la integridad de la membrana espermática equina utilizando la prueba de hinchamiento hipoosmótica y correlacionar esta prueba con diferentes parámetros de espermatozoides en el semen descongelado crudo y congelado. Las soluciones de HOS se hicieron con fructosa, sacarosa, lactosa y citrato de sodio, cada uno a 300, 150, 100, 50 y 25 mOsm. Las correlaciones entre la motilidad progresiva, los espermatozoides morfológicamente normales y la prueba HOS fueron $r = 0.75$ y $r=0.51$ en el semen crudo y $r=0.26$ y $r=0.22$ en el semen congelado-descongelado, concluyendo que los cambios morfológicos observados en los espermatozoides equinos después de ser sometidos a la prueba HOS, se producen en la cola de aquellos espermatozoides que poseen membranas intactas. Esto se confirmó

sometiendo a los espermatozoides con hinchazón a la mancha fluorescente vital. Se observó una alta correlación entre la motilidad progresiva y la prueba HOS; sin embargo, la motilidad progresiva mostró una mayor susceptibilidad al choque frío que la integridad de la membrana plasmática o la funcionalidad de la membrana. Esto parece indicar que la motilidad de los espermatozoides se ve más afectada por los factores de manejo del semen que la membrana plasmática. Por lo tanto, la prueba de evaluación de la membrana en plasma resultaría ser la más precisa para predecir la capacidad de fertilización de una muestra de semen. Por otra parte se llevó a cabo un estudio, colectando el primer y segundo eyaculado, concluyendo que muchos factores influyen en la estimación final del rendimiento reproductivo en granjas de sementales, la edad de los sementales, el número de yeguas asignadas a cada semental, la fertilidad de las yeguas. Como resultado se decidió dividir los sementales en dos grupos los sementales de fertilidad propuestos por Dowsett y Pattie (1982). Los sementales de fertilidad aceptable tenían espermatozoides más morfológicamente normales, pero no se encontraron diferencias entre los grupos para las anomalías de la cola, mostrando que la morfología anormal de la cola no tuvo influencia en los resultados de HOS. Un estudio donde se enfoca en optimizar el uso eficiente del semen de sementales criopreservados, investigaciones recientes se han centrado en la dosis mínima de inseminación de espermatozoides congelados y descongelados necesarios para la máxima tasa de fertilidad. Los resultados parecen ser altamente dependientes del semental. Factores tales como el momento de la IA con respecto a la ovulación, así como el sitio de la inseminación dentro del tracto reproductivo de las yeguas, también tienen éxito en la crianza con semen congelado-descongelado. Dado que se pueden lograr tasas de embarazo aceptables a partir de la inseminación de yeguas con un número muy bajo de espermatozoides, aumentar el número de dosis de inseminación procesadas a partir de una sola eyaculación puede resultar más rentable para los dueños de sementales (Metcalf, 2007). En otro estudio los objetivos fueron evaluar la correlación de diferentes patrones de HOST con parámetros de espermatozoides, deficiencia de protamina y apoptosis. Concluyendo que la tinción eosina ha proporcionado información sobre la integridad estructural de la membrana espermática, mientras que la prueba HOS ha proporcionado información sobre la integridad funcional

de la membrana espermática. En otras palabras, HOST evalúa "la capacidad de la membrana plasmática espermática para transportar agua en condiciones hipoosmóticas, lo que induce hinchazón de la cola y estiramiento de la membrana plasmática". Por lo tanto, HOST se ha considerado como una prueba fácil, económica y confiable para predecir el potencial de fertilidad masculina y la tasa de aborto espontáneo en individuos subfértiles (Bassiri, 2013).

RECOLECCION DE SEMEN EQUINO

Selección de la vagina artificial.

El procedimiento de recolección de semen se puede realizar fácilmente utilizando una vagina artificial (V.A.). La correcta selección de la V.A. es fundamental tanto en el proceso de recolección como de evaluación de semen. En el momento de elegir una, deben tenerse en cuenta no sólo las conveniencias en cuanto a sus características y costos sino también la preferencia del garañón. El modelo Missouri se encuentra ampliamente difundido por ser muy accesible económicamente, es liviana, fácil de manejar y relativamente fácil de limpiar. Se compone de una doble camisa de látex permanentemente sellada que funciona como cámara de agua. Una carcasa de cuero envuelve dicha camisa para facilitar su manipulación. Está equipada con una válvula que permite colocar agua sola, aire solo o la combinación de los dos para reducir su peso. El mantenimiento de la temperatura adecuada durante la recolección no es tan eficaz como en otros modelos de V.A. Lo importante es que en este modelo de VA los espermatozoides no están en contacto con la superficie caliente de la camisa de látex. El modelo Nishikawa, japonés, consta de un tubo metálico rígido de aluminio y una simple camisa de látex entre los cuales queda conformada la cámara de agua. Este modelo es de fácil manejo y limpieza aunque ligeramente más pesada que la anterior. La camisa debe ajustarse bien en ambos extremos mediante bandas de goma fuertes para evitar filtraciones de agua con la consecuente contaminación de la muestra. El modelo original de Colorado consta de una cubierta de material plástico duro y dos camisas de látex que componen la cámara de agua. De esta manera se logra un buen

mantenimiento de la temperatura. Debido a que el largo de la vagina es mayor al del pene, el eyaculado entra en contacto con la temperatura interna dañando por calor los espermatozoides. Se han hecho modificaciones a este modelo con el fin de hacerlo más liviano y fácil de manipular: es el modelo CSU (Colorado State University). Los modelos de V.A. antes citados son comúnmente llamados “cerrados” debido a que con ellos se obtiene una muestra de semen que contiene tanto la fracción espermática como la fracción de plasma seminal, es decir, el eyaculado completo. Con el objetivo de aumentar la concentración espermática recolectando sólo los primeros pulsos (jets) del eyaculado, en Polonia desarrollaron un modelo de V.A. “abierta” (modelo Krakow), en donde el glande se exterioriza en el extremo posterior y puede recolectarse sólo la fracción del eyaculado rica en espermatozoides (tres primeros jets). Así se obtiene del 75-80% de los espermatozoides presentes en una muestra con cerca del 50% del volumen total. La recolección de semen con este método reduce la contaminación de la muestra con orina y/o bacterias. Una alternativa poco usada es la recolección empleando un condón. Generalmente la muestra obtenida es de menor calidad que aquella obtenida mediante V.A. ya que se produce gran contaminación con bacterias y detritus provenientes de la superficie externa del pene. Sin embargo es una buena elección cuando se trata de padrillos acostumbrados al servicio natural y que nunca han sido entrenados a saltar con V.A. (Samper, 2007).

Preparación de la V.A.

El agua con que se completa la cámara de agua debe tener una temperatura de 50-54°C, de manera que la temperatura interna sea de 42-45°C. Es sumamente importante que la temperatura sea medida mediante un termómetro y nunca sea “estimada”; si la temperatura es inferior a la citada no habrá suficiente estímulo para la eyaculación y si es superior se podrá “quemar” al garañón con los consecuentes trastornos en su conducta sexual. La cantidad de agua a colocar debe acomodarse al tamaño del pene de manera tal que la presión sea uniforme a lo largo de toda la V.A. y no dificulte la penetración y erección completa del pene. Si la presión es excesiva no permitirá la correcta intromisión del pene con lo cual el semen tomará contacto con las paredes de la V.A. a altas temperaturas y se alterará la calidad de la muestra. La superficie interna

de la camisa debe lubricarse con algún elemento no espermicida, tal como gel estéril, la vaselina sólida daña la camisa de látex. El eyaculado debe protegerse de la luz y mantenerse a temperatura corporal hasta ser transportado al laboratorio. La filtración del eyaculado pos-recolección es esencial para separar la porción de gel de la porción rica en espermatozoides; esto puede hacerse mediante un trozo de gasa o aspirando el 2 gel con jeringa. Algunos modelos de V.A. traen botellas recolectoras con filtros incorporados que permiten realizar la operación de filtrado al mismo tiempo que la recolección. (Samper, 2007).

Recolección del semen.

Para la recolección de semen equino puede utilizarse como súcubo una yegua en celo natural o una yegua ovariectomizada mantenida con altos niveles de estrógenos exógenos (1-2 mg cipionato de estradiol, ECP, vía intramuscular semanalmente). También pueden utilizarse súcubos artificiales, para los cuales el garañón debe estar entrenado. Estos dos últimos métodos permiten disponer de un súcubo aún en la temporada anovulatoria. Previo a la recolección, el pene del garañón debe ser examinado para detectar posibles lesiones. Para lograr la exteriorización del pene, se presenta la yegua al garañón de modo que ni ella, ni el macho ni el personal corran peligro y puedan realizarse las maniobras apropiadamente. Una vez que se exteriorizó el pene, el operador lo toma con una mano, lo desvía y con la otra comienza la limpieza con agua tibia (a 37 ° C), sin agregado de jabones ni desinfectantes ya que los mismos remueven la flora bacteriana normal y permite el crecimiento de microorganismos patógenos, por ejemplo *Pseudomona aeruginosa*. Muchas veces es deseable realizar un análisis bacteriológico previo a la recolección de semen para descartar una infección del tracto genital del macho. La toma de muestras para cultivo debe hacerse antes del lavado del pene. Se toman cuatro muestras: a) de la superficie del pene; b) de la fosa del glande; c) de la uretra pre recolección y d) de la uretra pos recolección. Los hisopos deben remitirse al laboratorio en medio de transporte, por ejemplo Stuart. Generalmente la yegua usada para la recolección tiene una buena sujeción consistente en trabones, bozal y mordaza, para evitar que el padrillo sea lastimado. Las patadas durante la recolección de semen, además de producir una respuesta sexual negativa,

pueden causar traumatismo de pene, prepucio o testículo. La cola de la hembra debe ser prolijamente cubierta con una venda o guante largo ya que los pelos pueden enredarse y causar lesiones del pene durante el procedimiento. Debe evitarse en la medida de lo posible que el garañón actúe agresivamente durante la monta; para esto puede manejárselo con una cadena agregada al bozal. Todos los garañones son diferentes. La habilidad del personal para manejar al garañón de manera que se logre una respuesta sexual favorable con un mínimo de dificultades es un arte. Esta es la clave de muchos problemas de comportamiento sexual en garañones. El operador encargado de recolectar el semen debe colocarse generalmente del lado izquierdo junto con el personal que maneja al garañón. Debe estar muy atento a las reacciones tanto de la hembra como del macho. Sólo cuando el macho logra la erección, se le permite montar a la yegua o súcubo. El operador desvía el pene y presenta la V.A. al garañón para que mediante el reflejo de búsqueda, logre él mismo la intromisión. Es conveniente proporcionarle una posición confortable para lograr una máxima estimulación. Con la mano izquierda se sostiene la V.A. apoyándola contra la hembra y la mano derecha se coloca en ventral del pene con el objeto de palpar las pulsaciones asociadas con la eyaculación. La palpación de estas pulsaciones junto con el bandereo de la cola durante la eyaculación y la presencia de restos de semen o gel en el orificio uretral una vez terminada la recolección, y pérdida de la erección evidencian que la eyaculación se ha llevado a cabo. Inmediatamente después de retirada la V.A. debe colocarse ésta en posición vertical y permitir la salida de agua a través de la válvula para dejar que el semen que haya quedado en porciones altas de la vagina drene hacia la bolsita o botella recolectora. (Samper, 2007).

Características del eyaculado equino.

El eyaculado en los équidos está integrado por una masa de volumen considerable que varía entre 50 y 300 ml y está integrado por tres ondas eyaculatorias que en tiempos distintos se vierten sobre el colector. La primera procede de la próstata, es rica en electrolitos y de efectos espermio-estimulantes; la segunda procede de las ampollas de Henle y contiene los espermatozoides y la tercera procede de las vesículas seminales, que proporcionan la mayor parte del volumen al eyaculado y, desde el punto de vista biológico, representa un medio de tamponización y, por tanto, de protección biológica a los espermatozoides (Caiza de la Cueva et al. 1997, Mottershead, 2000). El color del eyaculado de los équidos varía de un animal a otro y del régimen alimentario a que está sometido. En primavera, el color del esperma en los sementales alimentados con abundante forraje presenta tonalidades verdes (Mottershead, 2000). El semen obtenido presenta una fracción completamente líquida y azoospérmica y el estrato superior que lentamente se gelifica para tornarse en una especie de sustancia gelosa y viscosa como resultado de una reacción coagulante entre la enzima de origen prostático (coagulasa) y un sustrato procedente de la secreción de las glándulas vesiculares. La reacción es más rápida cuando el eyaculado se mantiene en reposo y a temperatura superior a 30° C (Malmgren, 1997). Según Rodríguez y Bustos (1996), el volumen del eyaculado puede variar desde 30 hasta 250 ml, dependiendo de las características individuales, la edad, la época del año, la frecuencia de montas y el método de recolección. El volumen mínimo aceptado en sementales de 2 años es de 30 ml y los mayores de 5 años deben eyacular no menos de 50 ml (Pickett, 1993). En el caballo la concentración de células espermáticas es tan baja que no produce ondas notables. Un semen aceptable debe tener no menos de 60 % de motilidad en las células espermáticas; valores menores de 50 % son muy subjetivos de infertilidad (Aurich et al. 1997, Goldman 2001).

Desarrollo del espermatozoide equino.

El espermatozoide es una célula haploide altamente especializada que se originan en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado

espermatogénesis. Estos túbulos seminíferos se encuentran tapizados por un gran número de células epiteliales germinales llamadas espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número. Un porcentaje de estas células sufrirán una serie de modificaciones hasta transformarse en los gametos masculinos. Sin embargo, estas células haploides ya diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad. Se precisa, por tanto, de una última fase de maduración durante su tránsito por el epidídimo, para desarrollar dichas características, (Amann, 2008).

Espermatogénesis.

Es el proceso de proliferación, maduración y diferenciación que tiene lugar en los túbulos seminíferos y mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas en las cuales, las células primordiales cambian su morfología, pierden algunas de sus organelas y se transforman en células diferenciadas. **Espermatogénesis:** poco antes de llegar a la pubertad, los gonocitos germinales se diferencian a espermatogonias en esta primera etapa, las espermatogonias experimentan una serie de divisiones mitóticas para mantener su número (espermatogonias tipo A) en primer lugar, y para producir tipo B que se dividirán nuevamente, dando espermatoцитos primarios, (Amann, 2008).

Espermatidogenesis: en esta segunda fase comienza la primera división meiótica, mediante la cual el espermatoцитo primario diploide va a originar dos espermatoцитos secundarios originando las espermátida, que son células de menor tamaño y más diferenciadas, (Amann, 2008).

Espermiogénesis: la espermátida esférica sufre una serie de cambios morfológicos hasta diferenciar la cabeza y la cola; sin alterarse ya la carga genética, (Amann, 2008).

Espermiación: en esta última fase se rompen las uniones de la espermátida madura y las células de Sertoli quedando liberada al lumen de los túbulos seminíferos. La espermátida pierde la mayor parte del citoplasma, su núcleo se condensa, y se produce la maduración del flagelo y del acrosoma.

La espermatogénesis tiene una duración en el caballo de 52 días. La participación de las células de Sertoli en la regulación y desarrollo de la espermatogénesis es de

vital importancia, ya que proporcionan soporte estructural y nutricional entre otras funciones. (Amann, Johnson, 2008).

Regulación de la espermatogénesis por apoptosis.

El mantenimiento de la arquitectura de los túbulos seminíferos y por tanto de la espermatogénesis se obtiene mediante un balance dinámico de proliferación y degeneración celular (Johnson, 2008, Franca, 2005). La apoptosis o muerte celular programada presente en las células somáticas, tiene un papel importante en la regulación de la espermatogénesis de todos los mamíferos, incluido el caballo, (Heninger, 2004). En el testículo, la apoptosis controla el número de espermatozoides que se producen, eliminando los anormales y en definitiva controlando la eficiencia final del proceso, (Johnson, 2008, Franca, 2005). Este fenómeno puede afectar a las células germinales en todas sus fases siendo más frecuentes en espermatogonias y espermatocitos, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Se estima que sobre un 75% de las espermatogonias tipo A y un 25% de espermatocitos y espermatidas degeneran por apoptosis de forma fisiológica en los testículos de un animal adulto, (Franca, 2005, Levy, 2001).

Maduración espermática en el epidídimo.

El epidídimo es el órgano encargado de proporcionar el ambiente idóneo para la maduración final de los espermatozoides y de su almacenaje, adquiriendo de este modo la motilidad y su capacidad para fecundar. El epidídimo está constituido por un tubo altamente replegado de epitelio pseudoestratificado compuesto por varios tipos celulares. Se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. El tiempo requerido por el espermatozoide para ir desde la cabeza a la cola varía según la especie. En el caballo es de 9-11 días. Durante el tránsito por este órgano el espermatozoide sufre una serie de transformaciones morfológicas y funcionales que le aportan características como la motilidad y la capacidad de reconocer la zona pelucida. Una vez madurados los espermatozoides se acumulan en la cola del epidídimo hasta la eyaculación (Cornwall, 2009).

Estructura del espermatozoide equino.

El espermatozoide de los mamíferos consta de 5 regiones; cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Desde el punto de vista funcional, es un transportador de la información genética. Por ello, debemos destacar la presencia de un núcleo muy condensado, una membrana plasmática muy sensible a los cambios térmicos y osmóticos y las mitocondrias.

La membrana plasmática: es una doble capa, compuesta fundamentalmente por lípidos, que recubre al espermatozoide. En condiciones normales, los grupos hidrófilos (cabezas) de los fosfolípidos de la membrana se disponen formando las capas, externa e interna de la bicapa lipídica, mientras que las colas hidrófobas se mantienen entre ambas capas. La deshidratación que ocurre durante la congelación, modifica esta disposición, forzando la coalescencia de las cabezas o la exposición de las colas. Los lípidos predominantes son los fosfolípidos y el colesterol. La composición de fosfolípidos de membrana y la relación colesterol/fosfolípidos difiere entre especies (aproximadamente 70% de los fosfolípidos, 25% lípidos neutros y un 5% de glicolípidos). La composición lipídica de la membrana esta correlacionada con la tolerancia al shock por frio; cuanto mayor sea la saturación de fosfolípidos con grupos acetilos, mayor tolerancia a los procesos de congelación y descongelación (Macías, 2010).

Parks y Lynch en 1992, se comprobó que la membrana plasmática del espermatozoide equino contiene menor porcentaje de colesterol que el de toro o el de cerdo. Esto le confiere menor tolerancia a los descensos de temperatura. La membrana plasmática consta además de una serie de proteínas integradas entre los lípidos. Estas proteínas actúan a modo de poros o canales, como receptores de unión a determinadas estructuras del aparato genital femenino (oviducto); como zona de unión específica de membrana, o bien presentan cadenas de carbohidratos que reaccionan con proteínas del medio.

La cromatina se encuentra compactada mediante proteínas específicas (protaminas) que se unen entre sí mediante puentes disulfuro (Macías, 2010).

El acrosoma se localiza en la porción del núcleo y es una vesícula especializada que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la presentación de la zona pelúcida del ovocito en la fecundación, los daños en la membrana plasmática o del acrosoma son irreversibles y pueden originarse por diversas causas entre las que se encuentran cambios osmóticos, shock térmico o cambios de pH. Estos cambios pueden causar una pérdida prematura del contenido acrosómico (Macías, 2010).

El segmento ecuatorial es una evaginación de la membrana plasmática del espermatozoide localizada en la porción media de la cabeza. Su fusión con la membrana plasmática del ovocito es fundamental para la fecundación. **Fosa de implantación** es el lugar de inserción del flagelo en la cabeza. En el 50% de los casos y de forma fisiológica en el caballo, esta inserción de la cola no es central, sino abaxial. Por ello el patrón de motilidad progresiva en el caballo no es tan rectilíneo como en otras especies. El cuello es la unión entre la cabeza y la pieza intermedia. Está constituido por el capitulum, mitocondrias, el centriolo proximal y una serie de columnas laminadas que proporcionan gran flexibilidad al espermatozoide para moverse lateralmente durante la batida flagelar. El flagelo es el responsable del movimiento y lo constituyen tres regiones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. El flagelo está constituido en su totalidad por el axonema que es la estructura que le confiere el movimiento. El axonema está formado por una serie de micro túbulos agrupados en dobletes y se distribuyen en uno central y nueve periféricos.

La pieza intermedia (PI): se caracteriza por la presencia de una doble hélice de mitocondrias. Estas organelas, además de ser las responsables del metabolismo energético y de la regulación de muerte celular, se ha comprobado recientemente que son la mayor fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno, las mitocondrias se disponen alrededor de 9 pares de fibras longitudinales denominadas “fibras densas”, que rodean al axonema. La pieza intermedia queda limitada caudalmente por el anulus que es la zona donde la membrana plasmática se condensa (Koppers, 2010).

La pieza principal (PP): constituye la porción de la cola. Está formada por las 9 fibras densas y el axonema que se continúan desde la zona intermedia. Las fibras van reduciendo su tamaño hasta desaparecer al final de la PP. **La pieza terminal (PT):**

constituye la pieza final de la cola, y está formada por el axonema, sin vaina fibrosa (Hess, 1999).

FISIOLOGIA ESPERMATICA

La función primordial del espermatozoide es el transporte del material genético masculino, la penetración del ovocito y fusión con su ADN. El espermatozoide de los mamíferos es incapaz de fecundar el ovocito tras la eyaculación. Durante su tránsito por el aparato reproductor femenino, experimentara una serie de transformaciones (“Capacitación”), que consiste básicamente, en cambios de la fluidez y la permeabilidad iónica de la membrana, en un cambio en el patrón de motilidad y en la activación de vías de señalización intracelular dependientes de la cAMP/PKA (Gadella, 2001). Estos espermatozoides capacitados son ya capaces de alcanzar el ovocito, unirse a la zona pelucida y experimentar un nuevo cambio, la reacción acrosómica. Las proteasas liberadas por el acrosoma, mediante exocitosis, degradan las glicoproteínas que envuelven la membrana plasmática del ovocito, permitiendo que el espermatozoide fusione su núcleo con el del gameto femenino (Gadella, 1999).

Motilidad espermática

La motilidad espermática es una de las características funcionales básicas del espermatozoide. Existen dos tipos de movimiento espermático, un movimiento activo, propio de los espermatozoides eyaculados y cuya finalidad es avanzar en el tracto reproductor de la hembra (Turner, 2006). Este movimiento se caracteriza por ser simétrico, progresivo y con baja amplitud de onda. El movimiento hiperactivo, es el que experimentan los espermatozoides capacitados. La batida flagelar es asimétrica y de mayor amplitud con objeto de penetrar en la membrana del ovocito (Yanagimachi, 1970). La estructura que le confiere motilidad al espermatozoide es el axonema. Este necesita de ATP para poder realizar el movimiento de la cola. Las mitocondrias son las organelas encargadas de la producción de energía en el espermatozoide mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, su distribución se encuentra limitada al tracto intermedio. Turner y colaboradores, en el 2006, demostraron que el ATP producido en

las mitocondrias era suficiente para permitir la motilidad y que el ATP tendría que difundirse hasta alcanzar la totalidad de la cola. Sin embargo, diversos estudios han comprobado que el metabolismo aeróbico no es el único que abastece de energía al espermatozoide (Escalier, 2006).

El ATP puede provenir también del metabolismo anaeróbico de sustratos extracelulares como la glucosa o fructosa. La utilización de una vía u otra va a depender de la especie y de las condiciones del espermatozoide. Así por ejemplo, el espermatozoide humano mantienen un alto rango de glucólisis incluso durante la respiración aeróbica, y es capaz de mantener la motilidad en ausencia de oxígeno y/o en presencia de inhibidores mitocondriales, por lo que solo dependen de forma muy limitada de la respiración aeróbica, por lo tanto, el espermatozoide es capaz de generar energía por ambas vías metabólicas, aeróbica y anaeróbica (Williams, 2001).

Capacitación

Durante la capacitación el espermatozoide sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales hasta llegar a adquirir habilidad de fecundar el ovocito. Este proceso ocurre “in vivo”, durante el tránsito del espermatozoide por el aparato reproductor de la hembra entre otros cambios, tiene lugar la pérdida de proteínas que envuelven el espermatozoide y que provienen del plasma seminal (de Lamirande, 1997).

Estas sustancias son factores decapacitantes, que inhiben la habilidad de fecundar del espermatozoide. Además se produce un cambio en la distribución de los lípidos de las membranas, necesario para el reconocimiento y fusión con el ovocito. El colesterol de la membrana del espermatozoide limita su permeabilidad iónica, aportando una mayor rigidez y estabilizándola se ha demostrado que la albumina y lipoproteínas de alta densidad presentes en medios de cultivo o en el tracto reproductivo de la hembra, extraen el colesterol de la membrana del espermatozoide. Esta pérdida de colesterol incrementa la fluidez de la membrana y la hace permeable a iones. Posteriormente se produce un aumento del calcio intracelular, de bicarbonato y de peróxido de hidrógeno, que activan la adenil ciclasa para producir AMP cíclico. El aumento de AMPc activa la

proteína kinasa A (PKA), que finalmente acaba por fosforilar ciertas proteínas (Suzuki, 1988).

Reacción acrosómica

La reacción acrosómica consiste en un proceso de exocitosis mediante el que se liberan enzimas hidrolíticas presentes en el acrosoma. Estas enzimas degradan la zona pelucida (ZP) del ovocito para permitir la fusión del ADN del espermatozoide con el del gameto femenino (Knobil, 2006).

Esta reacción solo se produce tras la capacitación espermática. La ZP del ovocito está constituida por tres tipos de glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3). La ZP3 es el que desencadena la reacción acrosómica en el espermatozoide se produce además un aumento de pH y la activación de una serie de receptores (Bleil, 1980).

Durante la reacción acrosómica se produce una fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa en varias regiones del acrosoma. La fusión de las membranas provoca la formación de vesículas y la liberación progresiva del contenido acrosomal. La reacción es lenta y está regulada por cambios en la membrana y elementos del cito esqueleto. La liberación de las enzimas hidrolíticas junto con la hiperactivación espermática hacen posible que el espermatozoide penetre el ovocito y lo fecunde (Bou-Haila, 2009).

Comportamiento osmótico celular

Las células están siempre, limitadas de su medio circundante por una membrana superficial llamada membrana plasmática. Además, las células eucariotas de animales y plantas se encuentran compartimentalizadas en organelos por medio de membranas internas. Sin duda, una de las propiedades más sobresalientes de las membranas es su capacidad de actuar como barreras de permeabilidad selectiva y controlar la cantidad y naturaleza de las sustancias que la atraviesan. Es posible imaginar la evolución de la célula primitiva como una serie de macromoléculas catalíticamente activas rodeadas de una membrana, la cual era atravesada por sustratos, moléculas

más pequeñas, y algunos iones. La selectividad de esta membrana traería como consecuencia que la célula retuviera en su interior a las moléculas esenciales dentro de ella aun cuando su concentración en el medio exterior fuera muy baja y que también eliminara productos de desecho del metabolismo. Las células además, deben tener la capacidad de responder a cambios de su medio externo. Por ejemplo, el volumen celular solo puede cambiar de forma controlada, ya que un cambio de volumen altera la concentración de las moléculas dentro de la célula y un cambio brusco puede modificar las estructuras celulares. Este control del volumen celular se logra mediante la regulación de algunas sustancias orgánicas de bajo peso molecular u osmolitos y de iones inorgánicos. Las sustancias osmorreguladoras u osmolitos pueden ser el glicerol, azúcares, aminoácidos, potasio, sodio, etcétera. La permeabilidad de las membranas varía ampliamente. Por lo general los gases fluyen fácilmente a través de la membrana, y las moléculas pequeñas lo hacen con mayor facilidad que las moléculas grandes cuando son del mismo tipo. Las sustancias pueden difundir a través de la membrana de manera pasiva o por medio de un mecanismo que requiere de energía. La selectividad de las membranas permite que, en la célula y en los organelos, se mantengan medios o microambientes específicos de manera controlada. Esto logra que, a pesar de cambios en el medio exterior, los procesos bioquímicos en el interior se realicen de manera controlada y ordenada. Al mismo tiempo, las membranas permiten el intercambio entre el interior y exterior de los materiales necesarios como el oxígeno y los nutrientes, así como de los desechos metabólicos en sentido contrario. El control del movimiento de materiales a través de las membranas es de fundamental importancia en el proceso homeostático, ya que afecta directamente a propiedades como el pH, fuerza iónica, actividad enzimática y otras funciones metabólicas y osmóticas.

Presión Osmótica.

Osmótico, por su parte, es un vocablo que refiere a aquello que pertenece o está relacionado a la ósmosis (nombre que recibe el fenómeno físico-químico que implica el paso de disolventes, aunque no de soluto, entre dos disoluciones que poseen distinta concentración y que están separadas por una membrana semipermeable). Se entiende

por presión osmótica, por lo tanto, al nivel de fuerza que debe aplicarse sobre una solución cuando se necesita frenar el flujo de disolvente por medio de una membrana de características semipermeables. Esta particularidad resulta muy importante para entender las relaciones que se establecen entre los líquidos que forman parte de los seres vivos. La membrana semipermeable, permite que pasen las moléculas de disolvente pero impide el avance de las moléculas del soluto. Esto hace que las moléculas del disolvente se difundan y puedan pasar desde una solución con menor concentración a otra con mayor concentración. Para medir la presión osmótica se utiliza una herramienta que también data de mediados del año 1800 y que se denomina osmómetro. Cabe mencionar que este fenómeno juega un papel primordial en los organismos vivos y se puede observar directamente a nivel celular, en procesos de absorción y retención de las distintas sustancias. Luego de su estudio en gran diversidad de disoluciones de solutos de tipo no volátil, se establecieron los siguientes puntos: Siempre que la presión no sufra ninguna alteración, la presión osmótica se mantiene en una proporción directa a aquélla de la concentración de soluto; Para cualquier disolución en particular, su presión osmótica tendrá una proporción directa a la temperatura; Si se toman dos concentraciones que tengan igual cantidad de moles y se las somete a una temperatura en particular, presentarán una presión osmótica equivalente. Cabe aclarar que la molaridad es el valor que identifica el porcentaje de masa del soluto que se encuentra en cada parte de disolución. La unidad que se utiliza para representar la presión osmótica, es la misma que para cualquier otra: el Pascal, abreviado como Pa. Sin embargo, también se puede usar la unidad Atmósfera, cuya abreviatura es atm (Caiza de la Cueva, 1997).

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio consistió en la utilización de ocho caballos de la raza cuarto de milla, estabulados en caballerizas individuales de 25 metros cuadrados, cuatro en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali B.C. México. Con dirección en Km 3.5 carretera a San Felipe, Fraccionamiento Laguna Campestre, hacinando el resto en RANCHO MÍ HACIENDA, con dirección en carretera a la bufadora Km 3.5, maneadero, Ensenada B.C. México. Dichos animales fueron alimentados con alfalfa heno, con una concentración de proteína de al menos 16%. Las edades promedio de los animales es de 10 años.

Para el procedimiento de recolección con señuelo,

Se procedió a realizarlo en 5 pasos: Organización del material y laboratorio, en este paso se procedió a acomodar todo lo necesario para la recolección y el análisis del semen, poner a temperatura corporal todo lo que en su momento tendrá contacto directo con el semen: laminillas, tubos graduados, pipetas, alícuotas, vaso recolector,

Preparación del señuelo:

Se prepara una yegua que se encuentre receptiva al garañón, evacuándola de contenido fecal, posteriormente lavando la región perianal de la yegua con jabón neutro y agua limpia, se hacen tres ciclos, siendo en el tercero donde se procede al secado con papel secante, secando la región de la vulva en dirección de abajo hacia arriba, es decir de la vulva hacia el ano, para no arrastrar partículas de heces hacia la vulva, y reducir el riesgo de contaminar la muestra. Una vez lista la vagina y la yegua, se le colocan trabones para las patas para hacer seguro el manejo tanto para el semental como para el personal.

Preparación de la vagina artificial:

Utilizamos una vagina artificial tipo Missouri con modificación en el vaso recolector de una vagina tipo colorado, limpia, lavada previamente con jabón neutro y enjuagado con agua destilada, lubricada con gel no espermicida, estéril y con temperatura promedio de 47°C. Una de las características de la utilización de este tipo de vagina es que es

más manejable que la tipo colorado, y que el eyaculado es depositado en el cono de la vagina la cual es un área fuera de donde se encuentra la temperatura elevada y previene el shock térmico, además la modificación en el vaso colector permite la utilización de microfiltros de polipropileno con poros dimensión de 120 micras, el cual nos permitió obtener un volumen de eyaculado libre de gel.

Preparación del garañón:

Esto primero logrando que el garañón recele a la yegua, el caballo va a desenvainar su pene, el cual se lava perfectamente primero con agua corriente, para eliminar el exceso de esmegma. Verificando y limpiando que la fosa uretral no tenga contenido, el llamado “frijol”, que no es más que una acumulación de tierra y esmegma la cual es una fuente de contaminación para nuestra muestra. Y dos lavados posteriores con agua destilada, y se deja secar (Samper, 2017).

Recolectar el garañón

Obtenido el eyaculado se procede a su evaluación, tomando en cuenta apariencia, color, volumen, motilidad, concentración y pH. Con una micropipeta se toman 100 uL de semen crudo, se depositan en una alícuota con 900uL de una solución hipoosmótica ajustada a 100mOsm elaborada con 17.12g de Sacarosa en 50 ml de agua destilada o desionizada y se incuba por 30 minutos a 37°C (Samper, 2007). La evaluación se complementa utilizando microscopia de campo claro a 100x, contando al menos 100 espermatozoides por laminilla, aquellos que muestran la típica anomalía de cola en espiral es indicativo de inflamación por lo tanto se dice que es positiva a la prueba de resistencia osmótica y se cuentan. El número de células que fueron incapaces de soportar el insulto osmótico y reaccionaron al medio, se cuentan se multiplican por 100 y se dividen entre el total de espermatozoides contados, a este resultado se le denomina porcentaje de HOST (Neild, 2000). Para el análisis estadístico se utilizó una prueba de análisis de medias y se contrastaron mediante prueba T, utilizando el programa estadístico R i386 versión 3.4.3

RESULTADOS

Los resultados de la prueba de Host de los caballos se presentaron de la siguiente manera:

Tabla 1.- Muestra el % de células que reaccionan a la prueba de Host de Enero a Junio en los garañones de Mexicali y Ensenada, así como sus medias y valor P.

Mes	c1	c2	c3	c4	Promedio	c5	c6	c7	c8	Promedio	Valor P
Garañones de Mexicali						Garañones de Ensenada					
ENERO	34	16	12	22	21	43	23	36	10	28	0.5
FEBRERO	39	19	17	14	22	29	14	18	16	19	0.4
MARZO	33	20	15	16	21	24	22	16	21	21	0.18
ABRIL	35	19	14	15	20	33	19	11	15	19	0.9
MAYO	41	17	9	13	20	13	15	12	14	13	0.002
JUNIO	29	15	10	5	15	22	14	4	11	12	0.63

Discusión

Dentro de los resultados que obtuvimos, encontramos que no hay diferencia estadística significativa en el comportamiento de las membranas espermáticas en semen crudo sometidas a la prueba en los 2 grupos de caballos, que comprende este estudio, coincidiendo con los diferentes autores que ya han realizado esta prueba en otras partes del mundo. Por lo que se considera que el comportamiento de las membranas espermáticas en la zona valle de Mexicali y zona costa del estado de baja california, se comportan iguales al resto de los lugares en los cuales se ha realizado estudios similares, observando ($r=0.551$), en donde se encontró 18.52 ± 9.11 para el grupo A y 17.64 ± 8.054 para el grupo B respectivamente. (Neild et al., 1997) reporto un estudio realizado en Maryland, con un número similar de ejemplares, donde evaluaron la integridad de la membrana espermática equina utilizando la prueba de hinchamiento hipoosmótico y correlacionar esta prueba con diferentes parámetros de espermatozoides en el semen crudo y congelado. Las soluciones de HOS se hicieron con fructosa, sacarosa, lactosa y citrato de sodio, cada uno a 300, 150, 100, 50 y 25 mOsm. Reportando un $r=0.51$ en el semen crudo. Por otra parte (Pérez, 2014) reporto un estudio realizado en Colombia donde fueron seleccionados cinco eyaculados de caballos criollos colombianos los resultados de la prueba hipoosmótica no reporta diferencias estadísticamente significativos para los tratamientos inmediato (39.4 ± 14.6), no encontrando diferencia estadística.

Recomendaciones: los resultados obtenidos al concordar con los resultados de otros investigadores en otras partes del mundo nos permiten a nosotros recomendar esta prueba como un indicador de viabilidad espermática, al evaluar la integridad de la membrana espermática.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals*; 40:310-329.
- Amann, R.P, The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*, 2008 29 (5) p. 469-87.
- Arcila Rivera, Adriana del Pilar (2003). *Educación para la salud sexual*. Universidad de Caldas. [ISBN 978-958-8041-83-4](#). p. 49.
- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*; 89(1-4):65-75.
- Aurich, J.E., Schonherr, V., Hoppe, H., Aurich, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology* 48:185-192, 1997.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. Assesment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*. 66:772-779.
- Bleil, J.D, and P.M. Wassarm, Mammalian sperm egg interaction identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 1980 P: 873-82.
- Caiza de la Cueva, F.I., Rigaud, T., Bonet, S., Miró, J., Eriz, M., Rodríguez-Gil, J.E. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of Ouabain. *Theriogenology*. 47:765, 1997.
- Cornwalt, G.A., New insights in to epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*, 2009. 15 (2) P.213-27.
- Correlation between Different Patterns of Hypo-Osmotic Swelling and Sperm Functional Tests. Farzaneh Bassiri, M. Sc., Marziyeh Tavalae, M. Sc., and Mohammad

Hossein Nasr Esfahani, Ph. D. INTERNATIONAL JOURNAL OF FERTILITY & STERILITY. Sep 18 2013.

DANIEL DOMINGO PEREZ QUINTERO , Tesis para grado de Maestría en Ciencias Veterinarias “EVALUAR EL EFECTO CRIOPROTECTOR DE LA DIMETILFORMAMIDA EN DIFERENTES TIEMPOS DE ADICIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN CABALLOS CRIOLLOS COLOMBIANOS”, UNIVERSIDAD DE LA SALLE, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Bogotá, Octubre 2014.

de Lamirande, G., P. Leclerc, and C. Cagnon, Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod*, 1997. P: 175-94.

Escalier, D., Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update*, 2006. P: 449-61.

Gadella, B.M., et al, capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2001 (3-4): P. 249-65.

Gadella, B.M., et al, Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q*, 1999. P:142-6.

Goldman, D. B. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*. 16:283, 2001.

González Vizcarra V.V. y Nuñez Rodríguez L.A. Reunión de avances de sobre reproducción asistida en animales domésticos Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias UABC, 2015.

Hypoosmotic test in equine spermatozoa. D. Neild, G. Chavez, M. Flores, N. Mora, M. Beconi and A. Agüero. *Area of Theriogenology. Faculty of Veterinary Sciences, University of Buenos Aires, Buenos Aires Argentina. Theriogenology* 51:721-727, 1999 Elsevier Science Inc.

Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis *Anim Reprod Sci*, 2008.

Knobil, E. a .J.D.N., *Physiology of Reproduction*, 2006.

- Koppers, AJ., M.L Garg, and R.J. Aitken stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, 2010 P: 112-9.
- Levy, R. and I. Seifer- Akinin, [Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2001, 59 (5): P.531-45.
- Losinno L. 2007. Avances en la aplicación de biotecnologías reproductivas en equinos, *Proceeding del VII simposio internacional de reproducción animal- IRAC*: 157-164.
- Macias Garcia, B., et al., Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim*, 2010.
- Malmgren, L. Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology*. 48:523, 1997.
- Mottershead, J. Artificial insemination. Article series for Horse Daily Planner. 2000.
- Neild DM, Chaves MG, Flores M, et al: The Hos test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000; 32:351-355.
- Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, et al. 2009, Cholesterol addition protects membrane integrity during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*; 118(2-4)194-200.
- Parks, J.E: and D.V. Lynch, Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 1992. P: 255-66.
- Pickett, B.W. Factors affecting sperm production and output. En: McKinnon AO, Voss JL, eds. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 809-820.
- Rodríguez, H., Bustos, O.E. Seasonality and freezability vs routine parameters in stallion semen. *Histol Histopathol*. 11:427, 1996.
- Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO, *Current Therapy in Equine Reproduction*, 2007, Evaluation of Raw Semen; 40:253-257.
- Suzuki, M. and T. Wakabayashi, Packing of DNA in cricket sperm. A compact mode of DNA packing. *J Mol Biol*, 1988, P: 653-61.

The efficient use of equine cryopreserved semen, E.S. Metcalf, Honahlee PC, Sherwood, OR, USA. ScienceDirect, Theriogenology, 2007 Elsevier Inc.