

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



“MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN EQUINO POST  
DESCONGELACIÓN USANDO DOS CRIOPRESERVADORES”.

TESIS

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

PRESENTA:

CECILIA ESTHER GAXIOLA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

CO-DIRECTOR

DRA. OLGA MARITZA MANRÍQUEZ NÚÑEZ

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

NOVIEMBRE DE 2019

Motilidad progresiva del semen equino post descongelación usando dos criopreservadores. Tesis presentada por Cecilia Esther Gaxiola Sánchez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

---

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra  
Director de Tesis

---

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez  
Co-director de Tesis

---

Dr. Rafael Villa Angulo  
Asesor

---

MC. Luis Alonso Núñez Rodríguez  
Asesor

---

Dra. Yissel Sacnichte Valdés García  
Asesor

Mexicali, Baja California, Noviembre de 2019.

## Contenido

Lista de tablas .....	iv
Resumen .....	v
INTRODUCCIÓN .....	7
JUSTIFICACIÓN .....	8
REVISIÓN DE LITERATURA .....	11
Espermatogénesis.....	12
Anatomía espermática.....	13
Crioprotectores .....	16
Calidad Seminal.....	17
Análisis computarizado.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
RECOMENDACIONES .....	30
LITERATURA CITADA.....	31

## Lista de tablas

Tabla 1.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucio (0 minutos contra 15 minutos).....	266
Tabla 2.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucio (0 minutos contra 30 minutos).....	277
Tabla 3.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucio (15 minutos contra 30 minutos).....	277
Tabla 4.- Comparación entre criopreservadores a los 0 minutos .....	288
Tabla 5.- Comparación entre criopreservadores a los 15 minutos .....	28
Tabla 6.- Comparación de criopreservadores a los 30 minutos. ....	29

## Resumen

El estudio evaluó la motilidad espermática y su efecto post descongelación de semen de garañones, en 2 medios comerciales (Mexicano y Botucio®) y su efecto en 3 tiempos post-descongelación, se utilizaron sementales de raza cuarto de milla ubicados en ensenada (n=4) y Mexicali (n=4), el semen fue colectado mediante vagina artificial, los eyaculados fueron divididos alícuotamente para su procesamiento y adición del crioprotector de cada tipo, se congelo en vapores de nitrógeno líquido en pajillas de 0.5cc y almacenados en un termo criogénico para luego ser transportados al laboratorio de reproducción del hospital La Silla en Monterrey, N.L., para su posterior evaluación utilizando el sistema CASA donde se evaluó el parámetro de motilidad progresiva (PM) a 3 tiempos de descongelación (0, 15 y 30 minutos). Los datos fueron analizados mediante el procedimiento estadístico R obteniéndose las medias y desviaciones estándar y valores T expresados en porcentajes. Se observó un efecto en la criopreservación de Botucio® en los 3 tiempos 0, 15 y 30 minutos, con medias de 19.71, 17.31 y 16.26 respectivamente. Observándose valores  $P=0.016$ ,  $P=0.021$  y  $P=0.00042$  respectivamente. El efecto del criopreservador mexicano en sus tiempos de 0, 15 y 30 minutos, con medias de 17.65, 14.15 y 14.32 respectivamente, con valores  $P=7.26 \times 10^{-6}$ ,  $P=0.796$  y  $P=4.61 \times 10^{-5}$ .

**Palabras claves:** Motilidad, semen, equino, descongelación.

## Abstract

The study evaluated sperm motility and its effect after defrosting semen of stallions, in 2 commercial media (Mexican and Botucio®) and its effect in 3 times after defrosting, quarter-mile stallions located in Ensenada were used (n = 4 ) and Mexicali (n = 4), the semen was collected by artificial vagina, the ejaculates were divided aliquot for processing and addition of the cryoprotectant of each type, frozen in liquid nitrogen vapors in 0.5cc straws and stored in a thermos cryogenic to then be transported to the reproduction laboratory of the La Silla hospital in Monterrey, NL, for later evaluation using the CASA system where the progressive motility parameter (PM) was evaluated at 3 defrosting times (0, 15 and 30 minutes). The data were analyzed by means of the statistical procedure R obtaining the means and standard deviations and T values expressed in percentages. An effect on the cryopreservation of Botucio® was observed at 3 times 0, 15 and 30 minutes, with averages of 19.71, 17.31 and 16.26 respectively. Observing values  $P = 0.016$ ,  $P = 0.021$  and  $P = 0.00042$  respectively. The effect of the Mexican cryopreservator in its times of 0, 15 and 30 minutes, with averages of 17.65, 14.15 and 14.32 respectively, with values  $P = 7.26 \times 10^{-6}$ ,  $P = 0.796$  and  $P = 4.61 \times 10^{-5}$

**Key words:** Motility, semen, equine, defrosting

## INTRODUCCIÓN

El científico holandés Anton Van Leeuwenhoek inventor del microscopio, fue quien identificó por primera vez el espermatozoide en 1679. Posteriormente, en 1667, Nicolás Hartsoeker propuso la teoría del homúnculo, que consistía en la presencia dentro del espermatozoide de un hombre microscópico con una cabeza de gran tamaño. Más tarde, en 1780, Lazzaro Spalanzani fue el primero en inseminar artificialmente y dejar gestante a una perra, concluyendo que el espermatozoide es la célula de origen masculino implicada en la fecundación. Descubrió también, que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que sólo permanecían aletargados e inmóviles, recuperando la motilidad posteriormente. Los avances tecnológicos que se desarrollaron durante los siglos XIX y XX han hecho posible determinar tanto la estructura del espermatozoide como su función en la reproducción (Ortega, 2011).

El nacimiento del primer potro después de la inseminación con semen de seminal congelado se informó en 1957 (Barker and Gandier, 1957).

Desde entonces, se han logrado varios avances en la metodología de la criopreservación de esperma. El uso de semen congelado tiene varias ventajas, como: menores costos de transporte, almacenamiento indefinido, mejor tiempo para la inseminación artificial y menor riesgo de transmisión de enfermedades venéreas. Sin embargo, el uso de semen congelado-descongelado presenta tasas de fertilidad más baja en comparación con el semen fresco o refrigerado (Samper y Morris, 1998; Watson 2000)

## JUSTIFICACIÓN

La inseminación artificial (IA) ha acelerado la mejora genética debido a la comodidad involucrada en el transporte del semen desde la inseminación centro al lugar donde se insemina la yegua que ofrece una opción más amplia a los criadores fuera el país. Por lo tanto, el uso de IA se convierte en la técnica básica en la industria moderna. Además, el número de yeguas que pueden ser cubiertas por un semental durante la temporada reproductiva aumentará debido a la posibilidad de dividir el eyaculando en varias dosis de inseminación (Ali et al., 2014).

Una encuesta realizada en 2004, por la American Horse Council Foundation, indicó que allí son aproximadamente 9.2 millones de caballos en los Estados Unidos, y se estima que el caballo estadounidense y su industria aporta aproximadamente \$ 101.5 mil millones al producto interno bruto (PIB) del país. Desde su introducción Hace más de 30 años, la inseminación artificial en la industria de la cría de caballos ha crecido constantemente. En 2004 se criaron aproximadamente 440,000 yeguas registradas, de las cuales 88% (387,200) eran razas que permiten el uso de inseminación artificial. Tras el desarrollo de técnicas comerciales de semen que puede ser transportado refrigerado o congelado hace aproximadamente 20 años, los criadores se dieron cuenta rápidamente de los beneficios de transportar semen. Más recientemente, las limitaciones logísticas (tiempo, distancia y demoras en el transporte) en semen refrigerado y los beneficios adicionales del semen congelado ha llevado a los criadores a mirar hacia el semen congelado como un método práctico y eficiente para transportar o almacenar semen de sus sementales (Loomis, 2007).

Esto cobra importancia para la especie equina, especialmente en los casos de crianza de caballos con fines deportivos y de recreación, dado que tienen una gran trascendencia económica, razón por la cual los investigadores buscan y evalúan nuevas y mejores tecnologías para esta especie (Varela et al., 2015)

El congelamiento de semen permite una serie de ventajas adicionales, entre las que se destacan la posibilidad de usar el semen fuera de la estación

reproductiva, la extensión de la vida reproductiva de machos sobresalientes más allá de su vida y la posibilidad de comercialización de semen (nacional e internacional) (Leboeuf et al., 2000).

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la motilidad progresiva del semen equino post descongelación usando dos criopreservadores.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar si la motilidad progresiva es mejor utilizando un criopreservador brasileño o un criopreservador mexicano a tiempos de análisis de 0, 15 o 30 minutos después de descongelado el semen.

## HIPÓTESIS

Al menos un criopreservador es diferente.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Para una máxima eficiencia reproductiva, los sementales deben ser manejados para mantener un comportamiento sexual normal y una buena libido, permitiendo así la recolección de esperma de alta calidad utilizando métodos, intervalos y frecuencias de recolección apropiados. Una frecuencia de recolección y eyaculación recomendada para sementales en programas de Inseminación Artificial (IA) es hacerla en días alternos (Sieme et al., 2004).

. En efecto, se acepta generalmente que la motilidad de los espermatozoides es un factor determinante en la fertilidad normal del macho debido a su papel esencial para el transporte del material genético hasta el sitio de la fertilización. Los análisis funcionales y estructurales del semen son poderosas herramientas para predecir el potencial fecundante de los machos en varias especies (Pérez, 2015).

La raza cuarto de milla se subdivide en diferentes líneas según las habilidades resultantes de los distintos objetivos de selección, como una raza de importancia mundial, que corresponde al 52% de todos los caballos, estos son importantes debido a su gran versatilidad en diferentes eventos ecuestres (Tangari et al., 2013).

En los últimos siglos, esto ha culminado en la formación de muchas razas bien definidas, utilizadas para una variedad de propósitos con diferentes niveles de rendimiento. Durante las últimas décadas, el desarrollo de un mayor enfoque en programas de selección más eficientes ha acelerado la mejora genética en varias razas. La inseminación artificial y la transferencia de embriones han facilitado la diseminación del material genético (Groeneveld et al., 2010).

El uso de semen congelado del semental permite la difusión de material genético en todo el mundo y conserva el material genético del semental por tiempo ilimitado, pero la capacidad de fertilización de semen congelado/descongelado aún es inferior al semen fresco o refrigerado (Alvarenga et al., 2016), debido al daño por la criopreservación de las células espermáticas a través del choque frío y osmótico y así como también el estrés oxidativo (Baumber et al., 2003; Burnaugh et al., 2010; Pommer et al., 2002).

El espermatozoide (del griego *esperma*, semilla, y *zoon*, animal) o gameto masculino, es una célula haploide altamente diferenciada, que tiene por función transportar el genoma del macho y fusionarse con el gameto de la hembra (el ovocito), para dar lugar a un nuevo individuo diploide y propagar así la especie (Pérez, 2015)

### Espermatogénesis

El espermatozoide se origina en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas:

- La multiplicación o mitosis de las espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número.
- La meiosis, en la que los espermatocitos primarios diploides dan lugar a los espermatocitos secundarios haploides.
- La espermiogénesis, en la cual un porcentaje de estas células sufre una serie de modificaciones (cambios en su morfología y pérdida de algunas de sus organelas) para transformarse en células diferenciadas, que son los espermatozoides.

- La capacitación: que es una última fase de maduración y activación que se produce durante su tránsito por el epidídimo ya que estas células haploides diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad (Amann 2008).

La espermatogénesis tiene una duración en el caballo de 52 días. La participación de las células de Sertoli en la regulación y desarrollo de este proceso es de vital importancia, ya que proporcionan soporte estructural y nutricional a las células germinales entre otras funciones (Amann 2008).

Los espermatozoides capacitados ya pueden alcanzar el ovocito, unirse a la zona pelúcida 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 de la hembra (Pérez, 2015).

### Anatomía espermática

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 (Ortega, 2011).

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) (Ortega, 2011).

**Cabeza del espermatozoide:** es aplanada y está formada por el núcleo, el acrosoma y estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad del citoplasma. El núcleo está constituido por la cromatina altamente condensada, el acrosoma y el segmento ecuatorial y la fosa de implantación (Ortega, 2011)

Cromatina se encuentra compactada mediante proteínas específicas (protaminas) que se unen entre sí mediante puentes disulfuro (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

La pieza intermedia queda limitada caudalmente por el anulus que es la zona donde la membrana plasmática se condensa (Ortega, 2011).

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 (Ortega, 2011).

La pieza terminal (PT): constituye la pieza final de la cola, y está formada por el axonema, sin vaina fibrosa (Ortega, 2011).

Para llevar a cabo la fecundación, los espermatozoides deben tener intacta tanto la membrana plasmática como acrosomal y mantener una adecuada motilidad (progresiva). Con la criopreservación, la integridad de estas membranas puede verse afectada, así como la motilidad. Es así que se han desarrollado diversas técnicas para evaluar estos parámetros y así determinar la calidad seminal (Prado, 2011).

La evaluación de la viabilidad espermática permite determinar el estado de la membrana plasmática. Una de las técnicas más utilizadas es la tinción con eosina/nigrosina, donde por medio de un microscopio de campo claro se cuantifican los espermatozoides permeables y los no permeables a la tinción (Prado, 2011).

Espermatozoides que presentan daño en la membrana acrosomal, o que hayan sufrido reacción acrosomal tienen la misma incapacidad de fecundar que uno no viable o no motil (Squires y col 1999).

### Crioprotectores

El glicerol ha sido el crioprotector universal para el semen de sementales. Penetra en la membrana celular por difusión pasiva, permanece en la membrana y en el citoplasma e inflige efectos osmóticos nocivos a los espermatozoides. Además, se une a los fosfolípidos de la membrana celular reduciendo su fluidez (Alvarenga et al., 2016) La metilformamida tiene menor peso molecular y viscosidad que el glicerol, es más permeable al esperma del semental, causando menos daños (Alvarenga et al., 2005).

Los crioprotectores que combinan metilformamida y glicerol han ganado popularidad (Alvarenga et al., 2016), tienden a preservar la motilidad de los

espermatozoides mejor que los extensores comerciales que contienen solo glicerol (Álvarez et al., 2014; Darr, et al., 2016; Moffett et al., 2016) y se destacan en la preservación de las mitocondrias (Darr et al., 2016).

A pesar de los avances en la criopreservación del semen de un semental, la capacidad de fertilización del semen congelado y descongelado sigue siendo inferior al semen fresco o refrigerado, y por lo tanto, se deben utilizar los protocolos y medios de criopreservación más eficientes. (Jasko et al., 1992; Watson, 2000; Loomis, 2001; Samper et al., 2002; Vidament, 2005; Alvarenga et al., 2016).

En el semen congelado se intenta mantener la viabilidad de los espermatozoides mediante la aplicación de diluyentes y crioprotectores que alimentan al espermatozoide e impiden que se deteriore durante el proceso de congelación (Pérez. 2015).

### Calidad Seminal

Los sementales se seleccionan principalmente según su rendimiento, con poca consideración a la calidad del semen o la capacidad de sus espermatozoides para sobrevivir a la criopreservación. Como resultado, algunos eyaculados son de baja calidad y no sobreviven al almacenamiento o a la congelación (Al-Essawe et al., 2018). Debido a este hecho, los sementales se han clasificado como congeladores buenos, medios o pobres, de acuerdo con la capacidad de sus espermatozoides para resistir el proceso de congelación y descongelación.

La clara variación en la congelabilidad del semen de un semental es uno de los principales factores que determinan el éxito de la inseminación artificial con espermatozoides congelados-descongelados (Samper et al., 1991; Vidament et al., 1997).

En la evaluación de la calidad del semen se debe considerar que la competencia funcional se determina de manera multifactorial. El porcentaje de espermatozoides móviles después de la criopreservación muestra una pobre correlación con la fertilidad (Grondahl et al., 1994; Boyle, 1996). Sin embargo, la estimación precisa de la fracción de la población de espermatozoides que exhibe una motilidad progresiva y la medición de sus velocidades, deberían proporcionar una mejor información sobre la actividad metabólica y la capacidad de fertilización de las células del esperma. Los espermatozoides requieren una motilidad progresiva suficiente para superar las barreras del tracto reproductivo de la hembra para llegar al sitio de fertilización, y el patrón de movimiento de los espermatozoides está asociado con la competencia funcional en el proceso de fertilización (Amelar et al., 1980; Pacey et al., 1995; Suarez, 1996; Bedford 1998).

La evaluación de la motilidad de los espermatozoides se considera un determinante importante en el semen del semental. (Amelar et al., 1980; Galloway 1987; Amann, 1989). En la actualidad, el método más común para determinar la motilidad de los espermatozoides de los sementales es la estimación visual, usando el microscopio.

Como la motilidad espermática es un parámetro importante de evaluar, debido a que es necesaria para que los espermatozoides lleguen al sitio de la fecundación, además de facilitar el traspaso de éstos a través de la zona pelúcida. Si bien existen métodos que permiten realizar una evaluación de la motilidad de manera rápida y fácil, mediante observación microscópica directa, también se puede utilizar una evaluación computarizada, siendo más precisa y objetiva (Squires et al., 1999).

La necesidad energética es suplida por en 90% por sustratos exógenos y el restante por los fosfolípidos, dependen del metabolismo aeróbico para la producción de ATP, produciendo peróxido de hidrogeno en las mitocondrias, esto causa una per oxidación de los lípidos el cual tiene un efecto adverso en las

membranas afectando la motilidad, viabilidad e integridad estructural, sustancias antioxidantes presentes en el plasma seminal reducen los efectos. Una vez consumido el oxígeno proporcionado por este depende del metabolismo anaeróbico, produciendo un aumento en la concentración de ácido láctico en el medio extracelular conduciendo a una disminución de pH que debe estar en un rango de 7.2 a 7.9 con menor producción de ATP causando una disminución en la motilidad (Palma, 2001).

Algunos otros aspectos como el pH del semen es uno de los factores esenciales que afectan la calidad del semen debido a su efecto sobre la motilidad y el metabolismo de los espermatozoides (Gadea, 2003). El ácido láctico es producido por el metabolismo glucolítico del esperma que conduce a un pH disminuido en el semen muestra (Khalifa et al., 2014). Se pueden soportar diferentes tipos de amortiguadores complementado con el extensor de semen para equilibrar el pH durante la preservación del semen. (Yániz et al., 2011).

Algunos aspectos importantes que destacan en la última década, con frecuencia han logrado, la fertilidad ya que el progreso ha sido asociado con el uso relativo a:

1. Nuevas técnicas de inseminación artificial, como la inseminación artificial uterina profunda , que permite el uso de una pequeña cantidad de espermatozoides;
2. Otros crioprotectores que no sean glicerol y nuevos extensores disponibles comercialmente que dan como resultado una mejor supervivencia;
3. Técnicas de selección de esperma para aumentar la calidad del semen congelado como filtrado de gradiente de concentración (Alvarenga et al., 2016).

Así mismo para una máxima eficiencia reproductiva, los sementales deben ser manejados para mantener su comportamiento sexual y buena libido, lo que permite la recolección de esperma de alta calidad utilizando métodos de recolección, intervalos y frecuencias apropiados (Pickett 1975).

Para la industria de la producción animal, la subfertilidad es de gran preocupación porque sigue siendo una medida no predecible. De hecho, la selección de machos para la reproducción de especies, requiere una evaluación *in vivo* de la fertilidad, que se lleva a cabo durante un período que puede ejecutarse desde varios meses a varios años (Bissonnette et al. 2009).

#### Análisis computarizado

El análisis espermático asistido por computadora (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) consiste en realizar repetidas fotografías por unidad de tiempo, lo que permite individualizar espermatozoides y construir una trayectoria espermática, mediante la utilización de algoritmos computacionales (Prado, 2011).

En la actualidad, hay más de 12 análisis diferentes de esperma asistidos por computadora (CASA) los sistemas están disponibles para la detección de movimiento de esperma en laboratorios de espermatología y en unidades de producción de semen (Amann y Waberski, 2014).

El desarrollo de un poderoso software CASA ha hecho posible estudios cinéticos de espermatozoides y mediciones objetivas de movimientos de espermatozoides (Verstegen et al., 2002).

Los sistemas CASA evolucionaron históricamente con fines comerciales y se vendieron inicialmente a laboratorios clínicos para evaluar la fertilidad del esperma humano (Amann y Katz, 2004). La evaluación de la motilidad del

esperma y otros parámetros cinéticos son una parte esencial del examen de calidad de los espermatozoides en muchas especies de mamíferos. No obstante de la inmediatez y precisión de estos softwares, varios investigadores utilizan los análisis no automatizados debido al alto costo de las opciones comerciales. Posteriormente, los sistemas CASA fueron producidos para el análisis de esperma de sementales, y poco después se adaptaron a muchas especies por Hamilton-Thorne en 1986.

## MATERIALES Y MÉTODOS

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, haciendo el resto en Rancho Mi Hacienda, con dirección en la carretera a la Bufadora km 3.5, Maneadero, Ensenada, B.C. México.. Dichos animales fueron alimentados con alfalfa, henos con concentración de proteína de al menos 16%. Las edades promedio de los animales es de 10 años.

Se realizaron dos recolecciones por mes durante todo el año para cada caballo, obteniéndose un total de 179 muestras tanto como para el crioprotector Mexicano como para crioprotector Brasileño y realizar su posterior evaluación en la descongelación.

### **Preparación de la yegua**

Se utilizó una yegua en celo receptiva al garañón, se evacuó el contenido fecal y se realizaron tres lavados de la región perianal con jabón neutro y agua potable, secando la región de la vulva de distal hacia proximal para evitar el arrastre de partículas de heces hacia la vulva y reducir el riesgo de contaminación de la muestra. Para garantizar la seguridad del manejo se utilizaron métodos de sujeción física (trabones) y química (xilazina) para evitar que el semental y/o personal sea lastimado.

### **Preparación del semental**

Al momento que se recela la yegua, el semental va a desenvainar el pene, el cual deberá ser lavado perfectamente primero con agua corriente y después con agua destilada, se verificará que la fosa uretral no tenga contenido, el llamado

“frijol”, que una acumulación de tierra y esmegma la cual es una fuente de contaminación para la muestra y se dejara secar.

### **Preparación de la vagina artificial**

Se realizó la recolección con una vagina artificial tipo Missouri con una modificación de la botella colectora de una vagina artificial modelo colorado para poder insertar una micromalla de nylon. Deberá estar limpia, lavada previamente con jabón neutro y enjuagado con agua destilada, se lubricará con gel no espermicida y estéril, se llenará con agua potable con una temperatura de 47°C.

### **Evaluaciones en semen fresco**

Una vez obtenida la muestra, se midió el volumen del eyaculado utilizando cilindros graduados de vidrio con capacidad de 100ml, se vertió el contenido de la botella colectora en su totalidad por la pared del cilindro.

Se determinó la concentración espermática utilizando un densímetro 591B marca ARS, se colocó 3.42 ml de una solución de formalina al 10 % en un cubo ya calibrado y se procedió a colocar 180 µl de semen libre de gel en el cubo. Mediante el densímetro se analizará la muestra y por diferencia de densidad óptica en esta muestra se obtendrá la concentración espermática expresada en millones por ml, de acuerdo a las especificaciones.

Para determinar la motilidad del eyaculado en fresco se colocó en un vial de 2 ml una alícuota de 100 µl de expansor de semen EZ Mixin previamente atemperados a 37.5 °C, se agregó posteriormente a este expansor 20 µl del semen libre de gel, con la finalidad de diluir la muestra, se agitó la alícuota gentilmente por 10 segundos, y posteriormente se tomará una muestra la cual se colocará sobre un porta objetos y se cubrió con un cubre objetos previamente atemperados a 37.5°C y se observará al microscopio (Primo Star Zeiss) bajo el objetivo 40X observando 10 campos para la determinación de motilidad, la cual será expresada en porcentaje.

## **Método de congelado**

Inmediatamente después de la obtención de las muestras para la evaluación en fresco, el eyaculado se mezcló 1:1 con el expansor de semen EZ Mixin previamente atemperados a 37.5 °C, y se distribuyó en porciones iguales para centrifugarlo por 18 minutos a 1600 revoluciones para formar una pastilla de espermatozoides a fin de concentrarlos y remover parte del plasma seminal (Wernli, 2010). deseamos en cada una de las pajillas que son 200 millones progresivamente motiles, se procederá a desintegrar la pastilla en los diferentes criopreservadores para ser empajillado, previamente se etiquetaran pajillas con los datos del semental así como la fecha de recolección, se cargaron y se retiró una pequeña cantidad usando un peine de burbujeo para proporciona un bolsillo de aire que después de sellada debe de quedar al centro, posteriormente serán colocadas en una rejilla y refrigeradas por una hora a 5 °C y después se colocará en una hielera de modo que las pajillas estén a 3-6 cm por encima del nitrógeno líquido durante 20 minutos hasta que alcancen una temperatura de -120 °C después de este tiempo las pajillas serán bajas a nitrógeno para ser almacenadas en bastones rotulados igualmente y guardadas en tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

## **Evaluaciones en semen congelado**

La evaluación de las muestras se llevó a cabo durante los meses de febrero y septiembre de 2018 en el Laboratorio de Procesamiento de Semen del Club Hípico la Silla, Monterrey, Nuevo León.

El proceso de descongelación fue por medio de inmersión en baño maría a 37.5°C durante 1 minuto y que posteriormente se transfirió el contenido de cada

pajilla de diferente criopreservador en alícuotas previamente atemperadas y rotuladas, así mismo se realizó en otra alícuota a una dilución de 50 millones/ml con diluyente de la marca ARS de congelación.

La motilidad de la dilución fue evaluada en un sistema de análisis computarizado (CASA) utilizando 10 tomas consecutivas, las imágenes obtenidas por cada campo fueron registradas utilizando un microscopio de luz de contraste de fases 20X (Olympus CX41) a través de un portaobjetos fijado a una altura de 20µm con cuatro cámaras (Leja Products, B. V., Nieuw-Venneps) y registradas por un software de análisis de movimiento (CEROS Hamilton Thorne Inc Thorne Biosciences).

Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo (tiempo de captura de la imagen) a través de la laminilla y registrando los siguientes parámetros para el semen: Motilidad total (MT), Motilidad progresiva (MP), Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media de trayectoria (VAP), Velocidad en línea recta (VSL), Índice de linealidad (LIN), Rectitud del movimiento (STR), Amplitud de Desplazamiento Lateral de la cabeza espermática (ALH) y Frecuencia de golpe cruzado (BCF), este procedimiento se realizó a los 0, 15 y 30 minutos para cada una de las 358 muestras

El análisis de los datos se realizó obteniendo las medias de los mismos, se utilizara una prueba de comparación de medias y se contrastaran mediante una prueba T, utilizando el programa estadístico R i386 versión 3.6.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio evaluó la motilidad espermática y su efecto post descongelación de semen de garañones, en 2 medios comerciales (Mexicano y Botucurio®) y su efecto en 3 tiempos post-descongelación, se utilizaron sementales de raza cuarto de milla ubicados en ensenada (n=4) y Mexicali (n=4), el semen fue colectado mediante vagina artificial, los eyaculados fueron divididos alícuotamente para su procesamiento y adición del crioprotector de cada tipo, se congelo en vapores de nitrógeno líquido en pajillas de 0.5cc y almacenados en un termo criogénico para luego ser transportados al laboratorio de reproducción del hospital La Silla en Monterrey, N.L., para su posterior evaluación utilizando el sistema CASA donde se evaluó el parámetro de motilidad progresiva (PM) a 3 tiempos de descongelación (0, 15 y 30 minutos).

El criopreservador mexicano presenta diferencia muy significativa, siendo su mejor tiempo de uso a los 0 minutos que a los 15 minutos. El criopreservador brasileño (Botucurio®), presenta diferencia significativa, siendo al tiempo 0 minutos de uso su mejor tiempo en comparación a los 15 minutos como se observa en la tabla 1.

Tabla 1.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucurio® a su tiempo en 0 minutos contra 15 minutos.

	<b>Media en tiempo 0 minutos</b>	<b>Media en tiempo 15 minutos</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
<b>Criopreservador Mexicano</b>	17.65363	14.15084	$7.26 \times 10^{-06}$
<b>Criopreservador Brasileño</b>	19.71508	17.31285	0.0168

Diferencia muy significativa para el criopreservador mexicano siendo a los 0 minutos su mejor tiempo de uso en comparación a los 30 minutos. El criopreservador brasileño (Botucurio®) presenta diferencia significativa, siendo su mejor tiempo de uso a los 0 minutos que a los 30 minutos (Tabla 2).

Tabla 2.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucurio® a su tiempo 0 minutos contra el tiempo de 30 minutos

	<b>Media en tiempo 0 minutos</b>	<b>Media en tiempo 30 minutos</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
<b>Criopreservador Mexicano</b>	17.65363	14.32553	$4.61 \times 10^{-05}$
<b>Criopreservador Brasileño</b>	19.71508	16.26257	0.0004219

En ambos criopreservadores no se observa diferencia significativa entre sus tiempos de 25 y 30 minutos, sin embargo el criopreservador brasileño (Botucurio®) presenta una mejor media a los 15 minutos (tabla 3).

Tabla 3.- Comparación de criopreservadores mexicano y Botucurio® en el tiempo de 15 minutos contra 30 minutos.

	<b>Media en tiempo 15 minutos</b>	<b>Media en tiempo 30 minutos</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
<b>Criopreservador Mexicano</b>	14.15084	14.32553	0.796
<b>Criopreservador Brasileño</b>	17.31285	16.26257	0.2136

Diferencia significativa entre su tiempo a los 0 minutos en ambos criopreservadores. Mostrando el Botucrio® una mejor media (tabla 4).

Tabla 4.- Comparación entre criopreservadores a los 0 minutos

<b>Media en tiempo 0 minutos Criopresevador Mexicano</b>	<b>Media en tiempo 0 minutos. Criopreservador Brasileño</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
17.65363	19.71508	0.0406

Diferencia muy significativa. Botucrio® presenta una mejor media a sus 15 minutos (tabla 5).

Tabla 5.- Comparación entre criopreservadores a los 15 minutos

<b>Media en tiempo 15 minutos Criopresevador Mexicano</b>	<b>Media en tiempo 15 minutos. Criopreservador Brasileño</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
14.15084	17.31285	$4.44 \times 10^{-05}$

De acuerdo con los resultados obtenidos entre las comparaciones entre los criopreservadores a los tiempos de 0, 15 y 30 minutos podemos observar que el criopreservador mexicano entre los 15 y 30 minutos éste se mantiene y no hay diferencia significativa. Sin embargo el criopreservador brasileño (Botucurio®) a los 0 minutos trabaja mejor que el criopreservador mexicano, pero conforme pasa el tiempo éste va disminuyendo su efecto. Aun así el Botucurio® presenta diferencia estadística a favor (tabla 6).

Tabla 6.- Comparación de criopreservadores a los 30 minutos.

<b>Media en tiempo 30 minutos Criopresevador Mexicano</b>	<b>Media en tiempo 30 minutos. Criopreservador Brasileño</b>	<b>Valor p de la Comparación de las medias (prueba t)</b>
14.32553	16.26257	0.01164

## RECOMENDACIONES

La utilización del criopreservador brasileño se recomienda ya que presenta resultados estadísticamente significativos como lo muestran sus medias, sin embargo el costo del producto es elevado a comparación del criopreservador mexicano, el cual tiene un costo más accesible y su efecto logra mantenerse después de los 15 minutos. Una observación importante al momento de la inseminación con el semen descongelado, es el manejo de la yegua, la cual debe estar lista al momento de la descongelación y no rebasar los tiempos óptimos de utilización efecto que se requiera sea el adecuado dependiendo del crioprotector en su tiempo de uso.

## LITERATURA CITADA

- Al-Essawe E.M, Johannisson A, Wulf M, Aurich C, Morrell J.M. 2018. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*; 81:145–146
- Ali, A., Alamaary, M. and Al-Sobayil, F. 2014 Reproductive performance of Arab mares in the Kingdom of Saudi Arabia. *Tierarztl. Prax. Ausgabe G Grosstiere Nutztiere*, 42(3): 45-49.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89, 105–108
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., y Neto, C. R. 2016. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 32: 521–522.
- Alvarez, C., Gil, L., Gonzalez, N., Olaciregui, M., & Luno, V. 2014. Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, 69: 144–148
- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 10, 89–90.
- Amann, R. P. 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal of Andrology* 29 (5): 471-472
- Amann, R.P., Katz, D.F., 2004. Andrology Lab Corner: Reflections on CASA After 25 Years. *J Androl* 25:317–319

- Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5–8.
- Amelar, R. D., Dubin, L. and Schönefeld, C. 1980. Sperm motility. *Fertil. Steril.* 34: 197–199.
- Barker C.A.V, Gandier J.C.C. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci* 21: 47–51.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., y Meyers, S. A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24: 621–623
- Bedford, J. M.1998.Mammalian fertilisation misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be lytic event. *Biol. Reprod.* 59:1275-1276
- Bissonnette, Nathalie, Jean-Philippe Lévesque-Sergerie, Catherine Thibault, y Guylain Boissonneault. 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction* Cambridge,England 138 (1): 67-68
- Boyle, M. S.1996. Artificial insemination: assessing stallion semen quality after freezing. *J. Equine Vet. Sci.* 28, 5–6.
- Burnaugh, L., Ball, B. A., Sabeur, K., Thomas, A. D., y Meyers, S. A. 2010. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, 117:249–252

Darr, C. R., Cortopassi, G. A., Datta, S., & Varner, D. D. 2016. Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoa health and varies with cryopreservation media. *Theriogenology*, 86: 1382–1382.

Gadea, J. 2003 Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish J. Agric. Res.* 1(2): 17

Galloway, D. B. 1987. An infertility syndrome in stallions associated with low sperm motility. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 35: 655–656.

Groeneveld, L. F., J. A. Lenstra, H. Eding, M. A. Toro, B. Scherf, D. Pilling, R. Negrini, E. K. Finlay, H. Jianlin, E. Groeneveld, and S. Weigend. 2010. The GLOBALDIV Consortium. Genetic diversity in farm animals-a review. *Animal Genetics.* 41:6-8

Grondahl, C., Grondahl, M. L., Hyttel, P. y Greve, T. 1994. Acrosomal status in fresh and frozen/ thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. *Anat. Embryol.* 190:195–196

Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E., Squires, E. L., Amann, R. P., & Pickett, B. W. 1992. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed semen. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (USA).* 38:649–652

Khalifa, T., Rekkas, C., Samartzi, F., Lymberopoulos, A., Kousenidis, K. y Dovenski, T. 2014. Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. *Maced. Vet. Rev.* 37(1): 5-6.

- Leboeuf, B., Restall B, Salamon, S. 200. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 62: 113
- Loomis, P. R. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science.* 68:191–192.
- Loomis, P.R. 2007. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction science.* 105:119-120.
- Moffett, P., Fors, G., & Graham, J. K. 2016. Cryopreservation of stallion sperm in freezing diluents containing glycerol alone or a combination of cryoprotectants. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43.
- Ortega, F.C. 2011. Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta en la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. Tesis doctoral. Departamento de Medicina Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- Pacey, A. A., Davies, N., Warren, M. A. Barratt, C. L. R. and Cooke, I. D. 1995. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reprod.* 10, 2603–2609.
- Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- Perez, R. A. 2015. Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen equino criopreservado. Tesis doctoral. Zootecnia y Gestión Sostenible. Conservación de Recursos Genéticos Animales. Universidad de Córdoba.

- Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Seidel, Jr. G.E., 1975. Reproductive physiology of the stallion. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J Anim Sci.* 40:917–918.
- Pommer, A. C., Rutllant, J., y Meyers, S. A. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58: 1373–1375
- Prado, A. J.C. 2011. Comparación de dos métodos de criopreservación de semen equino, nitrógeno líquido vs -80°C, utilizando diluyentes hipometabolizantes. Tesis para obtener título de médico veterinario. Instituto de ciencia animal. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad austral de Chile.
- Samper J.C., Morris C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*; 49:895–896
- Samper, J. C., Hellander, J. C. and Crabo, B. G. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 44:107–108
- Samper, J. C., Vidament, M., Katila, T., Newcombe, J., Estrada, A., & Sargeant, J. 2002. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: A multi-center study. *Theriogenology*, 58: 649–650.
- Sieme, H & Katila, Terttu y Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*. 61: 769-772.
- Suarez, S. S. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *J. Andrology* 17:331–332.

- Squires E.L., Pickett, B.W., Graham, J.K., Vanderwall, D.K., McCue P.M. y JE Bruemmer J.E. 1999. Biology and structure of spermatozoa and their response to cooling. Colorado State University, Colorado, USA, Pág: 3-4
- Tangari, C. M., R. C. Abdallah, J. S. S. Vasconcelos, M. J. C. Monteiro, H. Nunes de Oliveira, and M. D. Silveira da Mota. 2013. Morphological and Genomic Differences Between Cutting and Racing Lines of Quarter Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33:244-245
- Varela G. E., Duque C.J., Ramírez H.M., Ocampo V.D., Montoya P.J.D., Restrepo B. G. 2015. Efecto de Cuatro Métodos de Separación Seminal sobre la Calidad y la Capacidad Fertilizante in vitro de Espermatozoides Equinos Criopreservados. *Rev. investig. vet. Peru* 26:3
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology*. pág. 149–150
- Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 89, 115–117.
- Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P. and Palmer, E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907–908.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 60:481–482.
- Yániz, J. L., Mateos, J. A. y Santolaria, P. 2011. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. *Small Rumin. Res.* 95(1):54-55