

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DEL SEMEN EQUINO
DESCONGELADO USANDO DOS CRIOPROTECTORES Y SU EFECTO
SEGÚN ÉPOCA DEL AÑO EN BAJA CALIFORNIA.**

TESIS

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

PRESENTA:

ERIKA IRAIS REYES LUNA

DIRECTOR DE TESIS

DR. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. OLGA MARITZA MANRÍQUEZ NÚÑEZ

Mexicali, Baja California, México

Noviembre de 2019

Características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en Baja California Tesis presentada por Erika Irais Reyes Luna, 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

M.C. Luis Alonso Núñez Rodríguez
Asesor

Dr. Martín Francisco Montaña Gómez
Asesor

Mexicali, Baja California, Noviembre de 2019.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante esta etapa. A la Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez por el apoyo brindado como coordinadora del programa de Maestría en Ciencias Veterinarias. Así como al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme seguir formándome profesionalmente y hacerme participe de este proyecto.

Al Hípico La Silla y a los médicos del Hospital Veterinario La Silla, por permitir realizar la evaluaciones en sus instalaciones, en especial al M.V.Z. Juan José Vázquez y al M.C. Claudia Concepción Méndez Pérez por todas las atenciones y apoyo que brindaron.

Así como también todos los propietarios de los equinos que participaron en el proyecto, por la confianza y apoyo, en especial a Rancho Mi Hacienda por permitir también utilizar sus instalaciones y por el apoyo de todo su equipo de trabajo.

Un sincero agradecimiento a mi tutor el Dr. Víctor Manuel González Vizcarra, al M.C. Luis Alonso Núñez Rodríguez, al M.C. Alistair Génesis González González y al Dr. Rafael Villa Angulo por el apoyo incondicional, asesoramiento y por haber estado durante toda la realización de este proyecto y de quienes he aprendido, sin ustedes no sería posible.

A mi familia por haberme apoyado siempre en todas mis decisiones y su infinita paciencia.

DEDICATORIA

A mi madre María Paula Luna Bravo, gracias por haberme educado y ayudarme a ser la persona que soy en la actualidad, te dedico a ti todo lo que considero logro en mi vida entre los que incluyo este.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	11
JUSTIFICACIÓN	12
REVISIÓN DE LITERATURA	14
Anatomía del semental	14
Anatomía del espermatozoide equino	16
Cabeza del espermatozoide	16
El cuello del espermatozoide.....	17
El flagelo del espermatozoide	17
Espermatogénesis	18
<i>Espermatocitogénesis</i>	19
<i>Espermatidogenesis</i>	19
<i>Espermiogénesis</i>	19
<i>Espermiación</i>	20
Fisiología espermática	21
Estacionalidad reproductiva	22
Sistema de análisis computarizado (CASA)	23
Diluyentes del semen	27
Crioprotectores	28
Crioprotectores no permeables	29
Crioprotectores permeables	29
Factores que afectan la conservación del semen	30
MATERIALES Y METODOS	35
Clima en Baja California	35
Preparación de la yegua	36
Preparación del semental	37
Preparación de la vagina artificial	37

Evaluaciones en semen fresco	37
Método de congelado.....	38
Evaluaciones en semen congelado	39
RESULTADOS	42
CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Las cuatro estaciones astronómicas.....	36
Tabla 2. Motilidad total de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	43
Tabla 3. Motilidad progresiva de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	43
Tabla 4. Velocidad media de trayectoria (VAP) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	44
Tabla 5. Velocidad Lineal (VSL) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	44
Tabla 6. Velocidad Curvilínea (VCL) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	45
Tabla 7. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) ($\mu\text{m/s}$) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	45
Tabla 8. Frecuencia de Batida (BCF) (Hz) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.....	46
Tabla 9. Índice de Rectitud (STR) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año (VSL/VAP)*100.	46
Tabla 10. Índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.(VSL/VCL)*100	47

Tabla 11. Evaluación de todos los parámetros considerando solo el efecto de los diferentes crioprotectores..... 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tracto Reproductor del macho equino vista de disección sagital (Modificado de Ozanam F. y colaboradores, 2014) 15

Figura 2. Espermatozoide equino (Ortega, 2011)..... 18

Figura 3. Espermatogénesis; espermacitogenesis, espermatidogenesis, espermiogenesis, Espermiación (Ortega, 2011)..... 20

Figura 4. Diagrama demostrativo de como los instrumentos de análisis computarizado calculan los parámetros de VSL, MAD, BCF, VAP, ALH y VCL (Valverde, A., 2018) 25

Figura 5. Temperaturas mensuales máximas y mínimas en Mexicali y Ensenada en 2016 (INEGI, 2017) 36

Figura 6. Laboratorio de Procesamiento de Semen del Club Hípico la Silla, Monterrey, Nuevo León..... 40

Figura 7. Sistema de análisis computarizado (CASA). 41

RESUMEN

El estudio evaluó la motilidad espermática post descongelación en semen equino, en dos medios comerciales (Mexicano y Brasileño) en garañones de raza cuarto de milla, ubicados en dos localidades en Mexicali y Ensenada, el semen fue colectado con vagina artificial, los contenidos seminales fueron centrifugados, se mezclaron con los dos crioprotectores, se envasó en pajillas de 0.5 cc, se estabilizó por 60 minutos y se congela en vapores de nitrógeno por 20 minutos, las pajillas se llevaron al laboratorio de Andrología de la Silla en el estado de Nuevo León y por medio del sistema C.A.S.A.(Computer Assisted Sperm Análisis) se evaluaron los parámetros de motilidad como velocidad lineal media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), índice de oscilación (ALH), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (BCF), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), datos fueron analizados por medio del procedimiento R; el mejor índice de motilidad fue (BCF) mostrando diferencia significativa tanto para el crioprotector Mexicano y Brasileño, durante todas las épocas del año con excepción del invierno con el crioprotector Mexicano, para los garañones ubicados en Ensenada, parámetros como VAP, VSL, LIN se observó diferencia significativa solo durante la primavera con el crioprotector Brasileño, también para los caballos ubicados en Ensenada, en los parámetros MT, MP y BCF se observó diferencia significativa a favor de Mexicali pero no durante todas las temporadas, y para los parámetros VCL y STR no se mostró diferencia significativa para ninguna estación ni crioprotector, se analizaron también los datos indistintamente a la ubicación y estación del año, mostrando una diferencia muy altamente significativa ($P < 0.001$) con el crioprotector Brasileño los parámetros de MT, MP, VAP, VSL y VCL.

PALABRAS CLAVE: Equino, espermatozoide, crioprotector, C.A.S.A.

ABSTRACT

The study evaluated sperm motility after defrosting in equine semen, in two commercial media (Mexican and Brazilian) in quarter-mile race stallion, located in two locations in Mexicali and Ensenada, the semen was collected with artificial vagina, the seminal contents they were centrifugal, were mixed with the two cryoprotectants, stabilized for 60 minutes, packed in 0.5 cc straws, and frozen in nitrogen vapors for 20 minutes, the straws were taken to the Silla Andrology Laboratory in the state of Nuevo León and through the CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis) motility parameters were evaluated as mean linear velocity (VAP), rectilinear velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), oscillation index (ALH), mean displacement amplitude lateral sperm head (BCF), straightness index (STR), linearity index (LIN), data was rum analyzed by means of the R procedure; The best motility index was (BCF) showing significant difference for both the Mexican and Brazilian cryoprotectant, during all seasons of the year except for the winter whit the Mexican cryoprotectant, for the stallion located in Ensenada, parameters such as VAP, VSL, LIN. Significant difference was observed only during the spring with the Brazilian crioprotectant, also for horses located in Ensenada, in the MT, MP and BCF parameters significant difference was observed in favor of Mexicali but not during all season, and for parameters significant difference was observed in favor of Mexicali but not during all seasons, and for parameters VCL and STR no significant defference was shown for any station or cryoprotectant, the data was also analized regardless of the location and season of the year, showing a very highly significant difference ($P < 0.001$) with the Brazilian cryoprotectant the pareameters of MT, MP, VAP, VSL and VCL.

KEYWORDS: Equine, spermatozoon, cryoprotectant, C.A.S.A

INTRODUCCIÓN

Se documentó por primera vez sobre la preservación del semen en el siglo XVIII, pero el periodo más activo fue en el siglo XX. A partir de 1950 con la utilización de criopreservadores facilitó el uso de la congelación del semen y aún más con la utilización de la IA intrauterina (Rodríguez y Peña, 2013). El semen congelado es cada vez más importante en la industria equina ya que es una herramienta importante para el mejoramiento genético, tanto que actualmente se tratan de perfeccionar las técnicas para congelación, inseminación artificial y transferencias de embriones. La congelación de semen permite la preservación de las características genéticas de un semental por tiempo indefinido y permitir con esto transmitir las por generaciones sin alteraciones cuando sea requerido (Wernli, 2010).

Varios procesos como la adición de diluyente, centrifugación, refrigeración pueden afectar la membrana plasmática del espermatozoide, para evaluar su integridad funcional se realiza una prueba hipoosmótica (Sánchez y Garrido, 2013).

La principal ventaja de la inseminación artificial es que es una de las técnicas más importantes para el avance de la genética ya que se aprovechan las características de los diferentes sementales (Valencia et al., 1994) y también el control de enfermedades venéreas y disponibilidad de los registros exactos de servicios (Mejía, 2017).

La motilidad es una de las características más importantes asociadas con la habilidad fecundante de los espermatozoides lo que indica su viabilidad e integridad estructural. El análisis de semen asistido por computadora (CASA) permite una evaluación precisa y objetiva de diferentes características de movimiento del esperma con alta repetitividad. (Nagy et al., 2015)

JUSTIFICACIÓN

Muchos factores afectan el resultado de la IA, además de la calidad del semen y van desde los métodos de manejo y congelación del semen, dosis y tiempo de la IA, manejo y fertilidad de la yegua (Kuisma et al, 2006).

Como análisis de rutina se hace una evaluación macroscópica del eyaculado y en la evaluación por microscopía de los espermatozoides (Pesch et al. 2006; Restrepo et al., 2013); sin embargo, el análisis convencional ha sido poco efectivo en la predicción de la fertilidad del semen (Kuisma et al. 2006; Restrepo et al., 2013). La relación entre la calidad y la fertilidad del esperma puede estar limitada por el número de sementales examinados, así como el número de yeguas cubiertas por cada semental (Love, 2011). Restrepo y colaboradores en el 2013 analizaron la motilidad con microscopía de contraste de fases y el sistema CASA del semen criopreservado de tres caballos de la raza criollo colombiano (tres eyaculados cada uno) que fue congelado, en un diluyente (4% de yema de huevo, 5% de dimetilformamida). Se hallaron promedios de movilidad total de $54,3 \pm 10,1$ y $61,8 \pm 13,9$, para evaluación convencional y por el sistema SCA®, respectivamente. Donde no se encontró diferencia significativa entre los métodos de análisis.

Cuando se utiliza semen congelado, se debe inseminar lo más cerca de momento de la ovulación debido a la reducción de la longevidad de los espermatozoides en la mayoría de los sementales (Sieme et al., 2003).

HIPÓTESIS

No existe diferencia alguna en las características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en Baja California.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en Baja California.

Objetivos específicos

Determinar motilidad total

Determinar motilidad progresiva

Determinar velocidad media de trayectoria

Determinar velocidad en línea recta

Determinar velocidad curvilínea

Determinar desplazamiento lateral de la cabeza espermática

Determinar frecuencia de batida

Determinar rectitud de movimiento

Determinar el índice de linealidad

REVISIÓN DE LITERATURA

Anatomía del semental

El aparato reproductor está suspendido dentro de la cavidad pélvica por el saco genital y externamente por el escroto y el prepucio. Consta de dos testículos, glándulas accesorias (ámpula o ampolla, glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales) y el pene conformado por los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso y la uretra (McKinnon et al., 2011; Méndez C., 2015).

Los testículos se encuentran dentro de los sacos escrotales cada uno con un eje horizontal largo y el epidídimo ubicado lateralmente que se divide en cabeza, cuerpo y cola, el parénquima testicular está encapsulado por la túnica albugínea, que se proyecta en el tejido testicular y lo divide en lóbulos, cada testículo y epidídimo asociados están cubiertos por la capa visceral de la túnica vaginal que se adhiere a la túnica albugínea, el espacio estrecho formado entre las capas visceral y parietal de la túnica vaginal, es llamada cavidad vaginal y se comunica con la cavidad peritoneal (Carleton C., 2011).

El parénquima testicular está formado por el tejido intersticial y los túbulos seminíferos, el tejido intersticial está compuesto por células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos y fibroblastos. Los túbulos seminíferos están revestidos por el epitelio seminífero (células germinales) y las células de Sertoli y están compuestos túbulos seminíferos rectos donde estos convergen en los dos tercios craneales del testículo. Los túbulos rectos se fusionan con uno de los 13 a 15 conductos eferentes que conducen al conducto epididimario en la cabeza del epidídimo. El cuerpo del epidídimo se encuentra en el aspecto dorso lateral de cada testículo, la cola del epidídimo se adhiere al polo caudal del testículo. El tracto tubular continúa desde la epidermis de la cauda hasta el conducto deferente, el conducto deferente que suministra espermatozoides

maduros al colículo seminal. El conducto deferente se dilata en su porción final a medida que se acerca a la uretra pélvica, estas dilataciones se denominan ampollas del conducto deferente.

Los cordones espermáticos se extienden desde los anillos vaginales hasta el borde adjunto de cada testículo. Cada una está encerrada por la capa parietal de la túnica vaginal. El mesorquio rodea la arteria testicular, el plexo pampiniforme, los vasos linfáticos, los nervios y el conducto deferente.

El músculo cremaster, que se origina en el músculo oblicuo abdominal interno, se adhiere al borde lateral y caudal del cordón espermático proporcionando movimiento hacia arriba y hacia abajo del testículo para mantener la termorregulación (Carleton C., 2011)

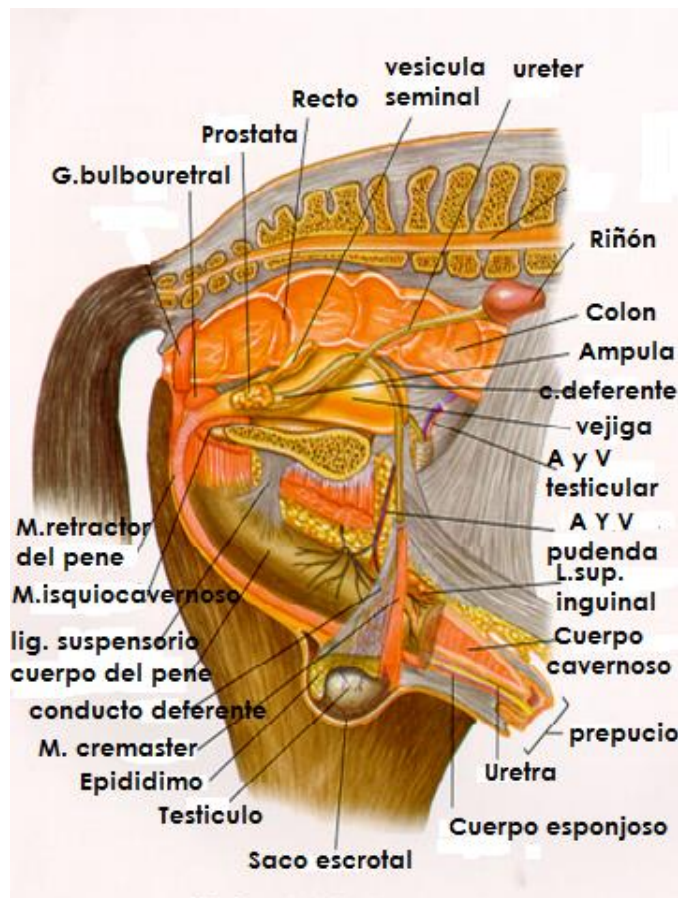


Figura 1. Tracto Reproductor del macho equino vista de disección sagital

(Modificado de Ozanam F. y colaboradores, 2014)

Anatomía del espermatozoide equino

El espermatozoide de los mamíferos consta de 5 regiones: cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Ortega C, 2011; Núñez, 2018). La medida de un espermatozoide equino es aproximadamente de 60µm y se encuentra rodeado en su totalidad por la membrana plasmática o plasmalema (firmemente unida al margen caudal de la cabeza), el anillo (annulus) y longitudinalmente a las columnas de la pieza principal, la membrana plasmática cambia en su composición durante el desarrollo y maduración, su función principal es prevenir el movimiento de proteínas y lípidos de la cabeza hacia la cola (Brito, 2007). 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 capas, externa e interna de la bicapa lipídica, mientras que las colas hidrófobas se mantienen entre ambas capas (Ortega C, 2011; Núñez, 2018).

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.

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

Acrosoma: se localiza en la porción anterior del núcleo y es una vesícula especializada que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito en la fecundación.

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 del espermatozoide

Es la unión entre la cabeza y la pieza media. 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 del espermatozoide

Es el responsable del movimiento y lo constituyen tres regiones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. Esta 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.

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, 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 se condensa.

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 (Ortega C, 2011; Núñez, 2018).

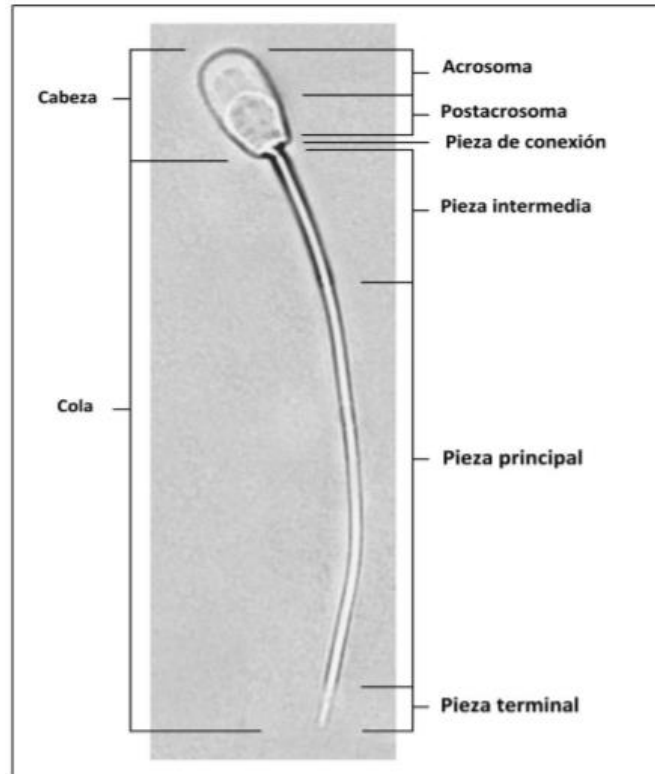


Figura 2. Espermatozoide equino (Ortega, 2011).

Espermatogénesis

Es el proceso cronológicamente organizado que involucra la multiplicación y diferenciación de las células germinales (espermatogonias) localizadas en el epitelio seminífero del testículo, que resulta en la formación de células especializadas llamadas “espermatozoides” que constituyen el gameto del macho.

La espermatogonia juega un papel fundamental en la regulación de la espermatogénesis, sin embargo, sus detalles siguen siendo relativamente oscuros en especies no ruidoras. El testículo equino contiene aproximadamente un 100% más de espermatogonias en el verano que en el invierno y parece ser un buen modelo para identificar los componentes flexibles

de la espermatogénesis que causan cambios estacionales en la producción diaria de espermatozoides en el semental, las diferencias estacionales son mayores en el número de espermatogonias que en la producción de espermatozoides (Johnson L., 1991).

La espermatogénesis se puede dividir en espermatocitogénesis, espermatidogénesis (meiosis), espermiogénesis y Espermiación (Brito, 2007; Méndez, 2015), en el caballo, esta secuencia dura aproximadamente de 55 a 57 días (Carleton, 2011)

Espermatocitogénesis

Es un ciclo de proliferación de las espermatogonias por medio de la mitosis para producir espermatocitos primarios y al mismo tiempo generar nuevamente un número propio y continuar con la línea de células germinales, con una duración de 19.5 días en los caballos (garañones).

Espermatidogénesis

Es la segunda fase donde comienza la división meiótica, mediante la cual el espermatocito primario diploide va a originar dos espermatocitos secundarios originando las espermatides haploides, que son células de mayor tamaño y más diferenciadas (Amann, 2008) teniendo una duración de 19.4 días. (Brito, 2007; Méndez, 2015).

Espermiogénesis

Es la porción de la espermatogénesis que implica la maduración de las espermatides redondas en espermatozoides (Carleton, 2011) que poseen una cabeza aplanada con el núcleo condensado y una vesícula con enzimas especializadas y la cola que es necesaria para la motilidad. La espermiogénesis no involucra divisiones celulares y tiene una duración de 18.6 días (Brito, 2007; Méndez, 2015).

Espermiación

En esta última fase se rompen las uniones de la espermatida madura y las células de Sertoli quedando liberada al lumen de los túbulos seminíferos, donde finalmente ocurre la maduración y adquieren la habilidad de fertilización, proceso que dura de 9 a 14 días. Es entonces que los espermatozoides presentes en el eyaculado se han producido entre 66 a 71 días, por lo tanto, la morfología espermática es un reflejo de los eventos ocurridos en 2 meses anteriores que influyeron en transporte y maduración de los espermatozoides a través del epidídimo (Aman, 1993; Brito, 2007; Méndez, 2015).

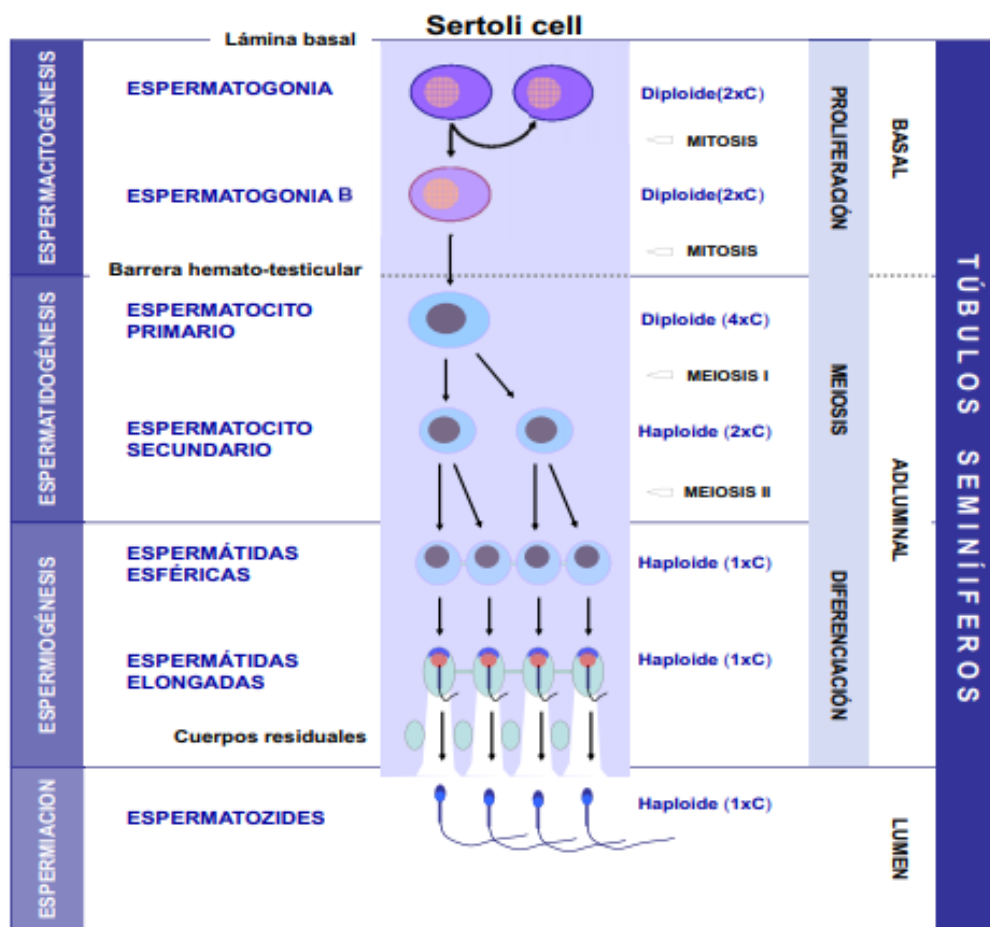


Figura 3. Espermatogénesis; espermacitogenesis, espermatidogenesis, espermiogenesis, Espermiación (Ortega, 2011).

La participación de las células de Sertoli en la regulación y desarrollo de la espermatogénesis es de vital importancia, ya que proporciona soporte estructural y nutricional entre otras funciones (Johnson, 2008; Núñez, 2018). En comparación con otras especies, el caballo tiene números intermedios de células de Sertoli por parénquima testicular por gramo y números por testículo. Sin embargo, la función de las células de Sertoli individuales, medida por la proporción de células germinales (espermatoцитos y especialmente espermátides redondas) por célula de Sertoli, fue mayor en el caballo que en otras especies a pesar de que el caballo exhibe una considerable degeneración de células germinales durante espermatogénesis (Johnson,2008).

Fisiología espermática

La función primordial del espermatozoide es el transporte de 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, experimenta 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/PKS. Estos espermatozoides capacitados son ya capaces de alcanzar el ovocito, unirse a la zona pelúcida y experimentar un nuevo cambio, la reacción acrosómica. La 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 (Ortega C, 2011; Núñez, 2018).

En la eyaculación, algunos millones de moléculas BSP-A1 / A2 se unen a la superficie del esperma. Parte de Estas moléculas permanecen adheridas a la membrana plasmática durante el transporte de esperma a través del tracto

genital femenino hasta la trompa de Falopio y parecen estar involucrados en el establecimiento de espermatozoides oviductal. La fuerte unión de BSP-A1 / A2 a la superficie del espermatozoide es mediado por su interacción específica con fosfolípidos que llevan un grupo principal de fosforilcolina (PC). Interacción de Las proteínas Fn-2 con membranas lipídicas y con espermatozoides epididimario provocan una rigidez efectiva de la membrana. A concentraciones más altas, las proteínas inducen un permeabilización de las membranas lipídicas y estimulan un flujo de salida de colesterol y fosfatidilcolina de las membranas celulares que resulta en la formación de partículas de proteína y lípidos. Este lanzamiento de lípidos que pueden verse alterados por factores secretados por el oviducto como glicosaminoglicanos similares a la heparina y lipoproteínas de alta densidad (HDL) es un proceso crucial de la capacitación de células espermáticas (Ekhiasi, M., et al, 2004).

Estacionalidad reproductiva

Las yeguas presentan particularidades en la fisiología reproductiva, la principal es que es poliestrónica estacional de fotoperiodo largo, presenta ciclos de duración variable (Durán, 2007). La duración del ciclo estral en las yeguas es de aproximadamente 21 ± 3 días, se describe comúnmente como una combinación de una fase folicular, o celo donde la yegua es receptiva al semental y comprende de 5-7 días, este es muy variable ya que al final de la etapa reproductiva la duración es de 7 a 12 días y alrededor del solsticio de verano es más corto durando de 3 a 4 días, y una fase lútea o diestro donde no existe aceptación y este finaliza con la regresión del cuerpo lúteo debido a la liberación de prostaglandinas ($PGF2\alpha$) en el endometrio, con una duración de 14-15 días (Raz T.y A. Raz, 2012).

Generalmente, los cambios en las características seminales del caballo y su comportamiento sexual, causado por la estación, coinciden con la estación reproductiva de la yegua. Los principales factores que determinan la producción espermática son la época del año, la talla testicular y la frecuencia

de eyaculación. Pickett et al. (1976) y Sharp y Davis (1993) señalaron variaciones en las características seminales del caballo, por los efectos estacionales con variaciones en el número de espermatogonias, espermatoцитos y producción diaria de semen (Díaz N., 2010)

En el semental, un "criador de día largo", endocrino y, en consecuencia, la función testicular germinativa están influenciados por la gestación. Como resultado en el hemisferio norte, las concentraciones de hormonas sexuales en plasma periférico muestran un patrón estacional definido con un aumento que comienza en febrero, máximo en abril y mayo y valores bajos nuevamente en el período de octubre a noviembre (Hoffmann B. y A. Landeck ,1999).

Sistema de análisis computarizado (CASA)

La estimación manual de la motilidad a través del microscopio resulta una técnica imprecisa, poco acertada y subjetiva; por otra parte, es de bajo costo y simple de realizarse, siendo requerida experiencia, entrenamiento y supervisión por parte del personal del laboratorio.

Los sistemas de análisis computarizado (CASA) otorgan información precisa y acertada con una variedad de características de movimiento del espermatozoide y pueden ser utilizadas para obtener una evaluación objetiva de la motilidad (Hoogewijs et al., 2011). Existen diferentes dispositivos y marcas que utilizan los sistemas CASA siendo los analizadores espermáticos más comunes CEROS o IVOS de la compañía Hamilton Thorne (Baumber-Skaife, 2011).

La habilidad del sistema casa de registrar muchos datos facilita la comparación de resultados y hace posible encontrar sutiles diferencias entre tratamientos, además este sistema parece tener alta exactitud y repetibilidad (Awad, 2011). Permite que cada esperma sea detectado individualmente y, al

determinar posiciones sucesivas de cabezas de espermatozoides en marcos de video, permite reconstruir la trayectoria de cada espermatozoide (Gaczarzewicz D., 2015).

En los cuales se determinan las características de movimiento espermático incluyendo:

La motilidad total espermática y progresiva continúa siendo una de las características más importantes cuando se hace la evaluación seminal a pesar de su pobre correlación con la fertilidad. La motilidad es generalmente considerada como un reflejo de la viabilidad de espermatozoides en una muestra. Espermatozoides no motiles o pobremente motiles son considerados incapaces de fertilizar sin la ayuda de técnicas de reproducción asistida.

Velocidad curvilínea VCL ($\mu\text{m/s}$), la longitud de la ruta real seguida por la función de los espermatozoides durante el tiempo, se informa a 1 decimal.

Velocidad media de la trayectoria VAP ($\mu\text{m/s}$), la longitud de la trayectoria suavizada seguida por el espermatozoide en función del tiempo, informada con 1 decimal.

Velocidad en línea recta VSL ($\mu\text{m/s}$), la "ganancia neta de espacio" (distancia entre el primer y el último punto de la pista) en función del tiempo, reportada con 1 decimal.

Índice de Linealidad LIN ($\text{VSL} / \text{VCL} \times 100\%$), una comparación de las longitudes (y, por lo tanto, las formas relativas) de las rutas de línea recta y curvilíneas, informadas como un porcentaje entero.

Rectitud de movimiento STR ($\text{VSL} / \text{VAP} \times 100\%$), una comparación de las longitudes (y, por lo tanto, las formas relativas) de las rutas de línea recta y promedio, informadas como un porcentaje entero.

Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ALH (mm), el ancho completo de la trayectoria curvilínea (en lugar de una amplitud verdadera), reportado como valor medio o máximo, a 1 decimal.

Frecuencia cruzada de batido BCF (Hz), una expresión calculada como el número de veces que la ruta curvilínea cruza la ruta promedio (VAP) en función del tiempo, informada con 1 decimal

En función de su progresividad, los espermatozoides son clasificados en: estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos. En función de su velocidad, llámese curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), velocidad media (VAP), se clasifican en: rápidos, medios y lentos. (Mortimer S. y C. Jonge , 2018).

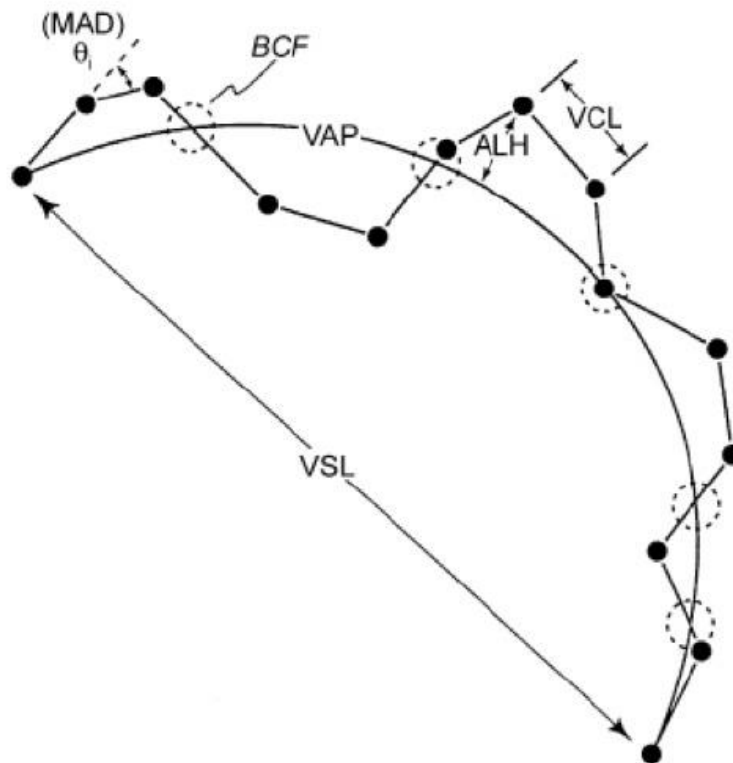


Figura 4. Diagrama demostrativo de cómo los instrumentos de análisis computarizado calculan los parámetros de VSL, MAD, BCF, VAP, ALH y VCL (Valverde, A., 2018)

Los sistemas CASA funcionan con principios similares, difieren en términos de características ópticas y de hardware, así como en algoritmos para la identificación de espermatozoides y la reconstrucción de la trayectoria (Gaczarzewicz D., 2015).

El sistema CASA también es valioso en la evaluación objetiva de la morfología de los espermatozoides, particularmente en especies con cabezas de esperma relativamente grandes. La morfología anormal es una indicación de perturbaciones en el desarrollo de espermatozoides en los testículos, por lo que puede servir como un marcador funcional de exposición a sustancias tóxicas para la reproducción y un predictor de fertilidad reducida. Esta información es invaluable en estudios de investigación de los efectos de nuevos productos farmacéuticos y en estudios de exposición ambiental

Aunque se ha demostrado que los sistemas CASA son más precisos que los métodos tradicionales pueden producirse variaciones en los resultados que induzcan al error, incluso cuando se utiliza la determinación computarizada de la movilidad espermática. Los resultados pueden verse influenciados por una serie de fuentes de variación, como la configuración del software, el número de imágenes capturadas, el número de campos analizados, la dilución de la muestra, la temperatura de la muestra y el tiempo transcurrido desde la eyaculación hasta el examen. Otros factores como la estandarización de los equipos utilizados, pueden influenciar los resultados, junto a la aptitud del técnico, el tipo de software y el tipo de cámara utilizada para el análisis (Valverde y Madrigal M., 2019).

Las velocidades espermáticas, principalmente velocidad curvilínea (VCL) y velocidad en línea recta (VSL) son las dos características cinemáticas relacionadas con el potencial de fertilidad. VCL es un herramienta para la formación de espermatozoides de reserva en la unión útero-tubal en ratones, mientras que los espermatozoides que presentan altos valores de VSL tienen un alto potencial de fertilidad en humanos, en equinos aún no hay estudios que demuestren una correlación directa pero se cree que el obtener valores alto, se puede pensar en un alto potencial de fertilidad (López C. *et al.*, 2007).

El ALH es un parámetro importante, ya que este es uno de los parámetros que afecta el resultado de la fecundación *in vitro* y la capacidad de los espermatozoides humanos para penetrar en el cuello uterino y su fusión con el ovocito. Este parámetro es importante ya que indica el vigor del latido flagelar junto con la frecuencia de rotación celular que probablemente son importantes para la progresión de los espermatozoides hacia el moco cervical (Verstegen J. *et al*, 2002)

Se puede indicar que la velocidad media (VAP) y curvilínea (VCL) son reconocidas como parámetros importantes en la evaluación del semen, debido a que son los responsables del transporte de espermatozoides a lo largo del tracto genital de la hembra (Verstegen *et al.*, 2002)

Verstegen *et al.* (2002) correlacionaron los parámetros cinéticos de los espermatozoides con la tasa de fertilización, encontrando que los valores de VAP, VSL y VCL fueron significativamente mayores en muestras que producen más del 50% de ovocitos fertilizados, que en aquellas donde la tasa de fertilización de ovocitos fue inferior al 50%. Muestras con altos valores de VAP, VSL y VCL, así como de LIN y BCF presentan mejor migración y penetración en el moco cervical, en forma similar, Cox *et al.* (2006) reportan que espermatozoides caprinos con velocidad eficiente en la migración del moco cervical *in vitro* presentan valores de LIN >50% y ALH = 4.8µm (Ormachea y colaboradores, 2019)

Diluyentes del semen

Diluyente es una solución acuosa que nos permite incrementar el volumen del eyaculado, preservar las características del semen y mantener el nivel de fertilidad (Gadea, 2003). El aprovechamiento de los efectos benéficos combinados de diferentes sustancias útiles para la protección de las células espermáticas ha enfocado muchos esfuerzos en la búsqueda de nuevas formulaciones de diluyentes que mejoren la conservación del semen equino, incluyendo otros ingredientes químicos para ajustar el pH y la osmolaridad, así

como la utilización de antibióticos con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano y de diversas sustancias antioxidantes (Restrepo G. et al, 2014).

Algunos diluyentes comerciales se destacan por su amplio uso para la criopreservación del semen equino, así como por las múltiples investigaciones realizadas para determinar su efectividad, como es el caso de los denominados INRA 82 e INRA 96, formulados con componentes como sales de Hanks, glucosa, lactosa, rafinosa, fosfocaseína, citrato sódico, citrato potásico y leche desnatada, y suplementados comúnmente para congelación con yema de huevo y glicerol. También han sido desarrollados y estudiados para la criopreservación de semen equino, el diluyente Cáceres, compuesto por solución de Hank suplementada con HEPES, glucosa, lactosa, BSA y fosfocaseinato de leche, yema de huevo, dimetilformamida y glicerol, y el diluyente Botucrio[®], compuesto por agua ultrapura, aminoácidos, carbohidratos, glicerol, amidas, gentamicina, penicilina y yema de huevo. Otras alternativas son el Gent[®], un diluyente compuesto de soluciones tampón, leche, yema de huevo y glicerol; y el Equipro[®], constituido por caseinatos, proteínas de suero, glucosa, sacarosa y sulfato de gentamicina (Restrepo G. et al, 2014).

Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a las que incorporan. El punto eutéctico es la temperatura más baja a la cual se puede fundir una mezcla de solutos con una composición fija. La disminución del mismo permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometida, es decir, se alcanza la misma concentración (Gutiérrez L., 2014).

Estas sustancias contienen componentes que protegen y permiten la supervivencia espermática fuera del tracto reproductivo y además cumplen la función de aumentar el volumen de la dosis inseminante. Los componentes que

hacen parte del diluyente deben suplir las necesidades metabólicas del espermatozoide como son la glucosa que constituye fuente de energía. Proveer capacidad protectora al shock térmico por medio de lipoproteínas presentes en la yema de huevo y la leche, como también es importante incluir una sustancia tampón que neutralice sustancias tóxicas que se producen en el metabolismo espermático como el ácido láctico (Wernli J., 2010)

Crioprotectores no permeables

Son compuestos de elevado peso molecular que no atraviesan la membrana plasmática, por lo que su efecto protector lo desarrollan en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos favoreciendo un medio hipertónico que hace que salga el agua de la célula (Gutiérrez L., 2014).

Crioprotectores permeables

Son compuestos de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana que producen una reorganización de los componentes lipídicos y proteicos de esta que hace incrementar su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación, actúan tanto en medio extracelular como intracelular (Gutiérrez L., 2014).

Moore y colaboradores en el 2006, determinaron que los espermatozoides congelados usando glicerol como crioprotector tuvieron porcentajes más altos de movilidad y motilidad progresiva en comparación con espermatozoides congelados utilizando los otros dos crioprotectores ($P < .05$). En conclusión, la supervivencia de los espermatozoides seminales es similar cuando las tasas de enfriamiento son de $5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ a $45^{\circ}\text{C} / \text{min}$. Cuando se usa 4% de crioprotector, el glicerol es un crioprotector más eficaz que el etilenglicol o dimetilformamida.

Factores que afectan la conservación del semen

En las últimas décadas el campo de la investigación de criopreservación de semen, ha sido pesadamente hacia estudios empíricos. Se han publicado muchos artículos en los que los efectos de variar algunos parámetros técnicos, como la concentración de crioprotectores, otros han examinado los aditivos, o las tasas de enfriamiento y calentamiento. Si bien esto pueden ayudar a mejorar la calidad del esperma después de la descongelación. Los temas de la criobiología espermática son de uso limitado para predecir el camino a seguir. Algunos investigadores los grupos han reconocido la limitación de este enfoque y se han centrado en modelar flujos hidráulicos que los espermatozoides experimentan durante el proceso (Holt W., 2000).

Existe una variación considerable entre los sementales individuales sobre como sobrevive su semen a la congelación y descongelación, Tischner M. en 1979 evaluó 200 eyaculaciones obtenidas de 36 sementales de las cuales estimo que aproximadamente el 20% de los sementales son “buenos congeladores” ya que sus características no fueron afectadas como la concentración espermática, el número total de espermatozoides vivos, motiles y morfológicamente normales, su habilidad para adaptarse a los cambios de condiciones osmóticas y su capacitación de una manera apropiada y en un tiempo adecuado, entre otras (Petrunkina et al., 2007) y la mayoría con un 60 % producen semen que es afectado adversamente pero se pueden congelar usando diferentes técnicas y el resto de las muestras siendo completamente inactivadas.

Los daños sufridos durante la criopreservación son clasificados por varios autores según su origen en daños debidos a los cambios de temperatura, de osmolaridad o a la acción de agentes oxidantes los cuales están relacionados (Gutiérrez, 2014).

Las glándulas accesorias (ámpula o ampolla, un par de glándulas vesiculares, una próstata y un par de glándulas bulbouretrales), vierten sus secreciones a la uretra, y al momento de la eyaculación se mezclan con los espermatozoides y secreciones ampulares del conducto deferente (Hafez y Hafez , 2000). El plasma seminal posee un perfil proteico característico de la especie (Palma, 2001). Existe evidencia de que el plasma seminal en el equino previene la capacitación prematura del espermatozoide, estabilizando el acrosoma o inhibiendo la unión con la zona pelúcida del ovocito (Arenas et al., 2010) y lo protege contra estrés oxidativo y a pesar de sus diversas funciones no es un medio ideal para la conservación de espermatozoides, siendo la fracción responsable la que se origina en las vesículas seminales, teniendo un efecto negativo en la motilidad vesículas seminales (Palma, 2001) y en los procesos de congelación de semen (Rueda, 2011).

La centrifugación es el metodo más utilizado para la separación del plasma, sin embargo existe una perdida de 10% al 20% en el sobrenadante, puede reducir la motilidad y aumentar las alteraciones morfológicas (Palma, 2001).

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 (Brinsko et al., 2011; Palma, 2001).

El uso de yema de huevo para la congelación de semen caprino está limitado al 3-4%, debido a una fosfolipasa presente en el plasma seminal (Aisen, 2004, Hernandez L. et al., 2013) proveniente de las glándulas bulbouretrales, la cual cataliza la hidrólisis de las lecitinas. Esto da como resultado la liberación de lisolecitinas y ácidos grasos al medio de dilución, los cuales resultan tóxicos para los espermatozoides, causando una mayor fusogenicidad de las membranas, favoreciendo al mismo tiempo la inducción de la reacción acrosómica y la condensación de la cromatina, lo cual deriva en un mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados y por tanto, una menor capacidad fecundante (Valencia et al., 1994;Salgado, 2016).

Los diluyentes en congelación de semen equino necesitan tener fuentes de energía y proteínas y además de un crioprotector como el glicerol (Hafez y Hafez , 2000). Por otro lado, cuando en el medio de congelación se incluye la leche descremada una lipasa del plasma seminal cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de la membrana plasmática y de la leche, dando lugar a ácidos grasos libres (como el oleico) que son muy tóxicos para los espermatozoides (Valencia et al., 1994;Salgado, 2016). Acorde con Aisen, (2004), una indicación a seguir durante los protocolos de congelación es la separación previa del plasma, con la finalidad de evitar la acción de esta enzima.

Los cambios asociados a los cambios de temperatura durante la refrigeración son la variación en la fluidez de la membrana plasmática, reducción de metabolismo, lesión de acrosoma alteraciones en la motilidad como movimientos retrogrado, circular o perdida de la misma (Palma, 2001). Con el enfriamiento los lípidos sufren una transición en estado líquido cristalino a gel, estos tienden a agregarse y formar microdominios en áreas aun fluidas que no se unen con proteínas así que los bordes de estos se vuelven más frágiles sujetos a ruptura y permeabilidad de iones (Palma, 2001). Además, se forman huecos dando lugar a un desequilibrio iónico. Esto se traduce en daños celulares durante todo el proceso de criopreservación, lo que puede desencadenar una disminución de la fertilidad del semen congelado (Medeiros

et al., 2002), resultado de alteraciones en la distribución y la funcionalidad de las proteínas de membrana y del citoesqueleto (Gutiérrez L., 2014).

La mayoría de los protocolos de criopreservación de semen todavía favorecen el uso del glicerol en los medios, siendo ejemplo de esto, glicerol con metanol y etilenglicol permanecen a un grupo que penetra en la célula espermática, glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado para los espermatozoides de animales de granja, sin embargo, cuando el glicerol es utilizado en altas concentraciones tiene cierta toxicidad y también puede ser el que causa mayor daño osmótico en los espermatozoides debido a su permeabilidad a través de la membrana plasmática de los espermatozoides es mucho más baja que el agua y que muchos crioprotectores (Award, 2011).

El uso de criopreservadores es importante para preservar la vida celular a temperaturas muy inferiores a 0°C (Aisen, 2004) su función básica consiste en evitar daños originados principalmente por cambios osmóticos y/o a la formación de hielo intracelular (Salgado, 2016), ya que el agua intracelular no abandona la célula, formando grandes cristales, como resultado de un proceso de congelado a una velocidad alta. Ocurre lo contrario en respuesta a un congelamiento a velocidad baja, donde también la bicapa de fosfolípidos se comprime y rompe su estructura (Aisen, 2004). Este doble estrés osmótico provoca daño en la membrana plasmática, en el citoesqueleto y en las mitocondrias si se supera la tolerancia osmótica que está determinada entre los 450 y los 1500 mOsm/kg (Gutiérrez, 2014).

La criopreservación afecta fuertemente todos los aspectos del control del Ca_{2+} del espermatozoide, independientemente de otros factores. Estos resultados indican que las altas concentraciones intracelulares de Ca_{2+} de los espermatozoides criopreservados, pueden ser una de las razones por las cuales las yeguas deben ser inseminadas muy cerca de la ovulación para maximizar las tasas de embarazo usando semen criopreservado (Leopold et al., 2000).

La reacción acrosomal *in vivo* comienza con la estimulación de un agonista natural como es la progesterona o la ZP. Este estímulo provoca una entrada de Ca^{++} al espermatozoide provocando la desactivación de ATPasas, salida de H^+ y un aumento de pH intraacrosomal, activando enzimas (acrosina), induce modificaciones de lípidos y formación de segundos mensajeros que activan la reacción acrosómica y activación de enzimas (fosfolipasa A2, específica de fosfatidilcolina), que genera lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico sustancias necesarias para la reacción acrosomal (Arenas et al., 2010).

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, 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, heno 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.

Clima en Baja California

La temperatura máxima anual en Baja California es de 28.6°C (CONAGUA, 2016) y la temperatura media anual es de 18 a 19 °C. La temperatura media mensual en la zona costera es de 20°C, y la más alta se presenta en el mes de agosto, los meses más fríos son diciembre y enero. En la ciudad de Mexicali se han registrado temperaturas máximas extremas entre los meses de junio y agosto, las temperaturas más altas se presentan en los meses de mayo a septiembre son mayores de 30°C y la más baja en el mes de enero. (INEGI, 2019).

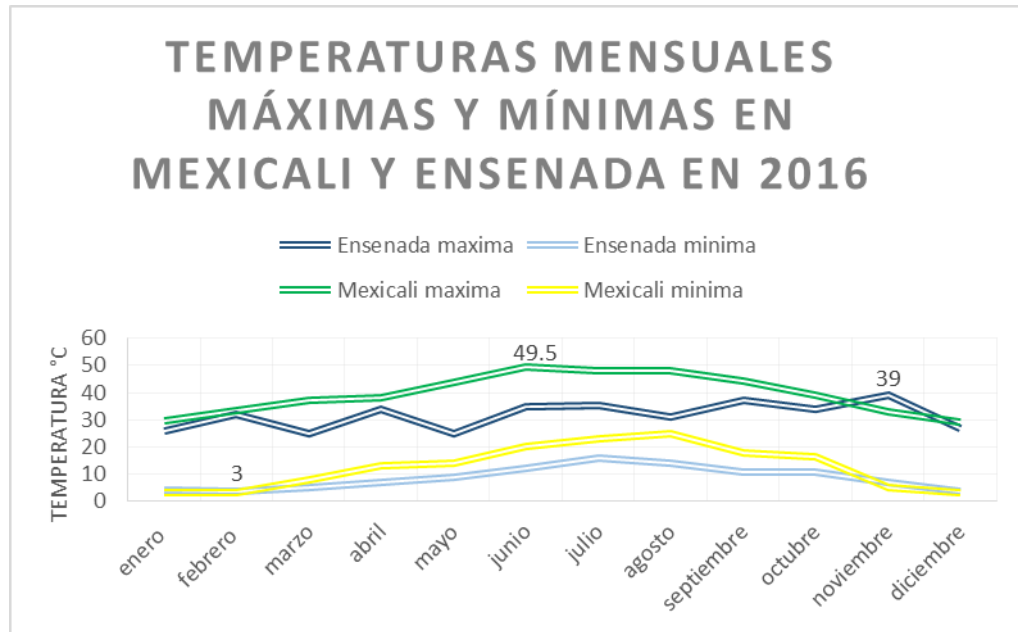


Figura 5. Temperaturas mensuales máximas y mínimas en Mexicali y Ensenada en 2016 (INEGI, 2017)

Inicio	Hemisferio norte	Duración (días)	Inclinación
20-21 marzo	primavera	92.9	0 °
21-22 junio	Verano	93.7	23,5° norte
22-24 septiembre	Otoño	89.6	0 °
21-22 diciembre	invierno	89	23,5 ° sur

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 (Dascanio y McCue, 2014).

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 (Dascanio y McCue, 2014).

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 (Hafez y Hafez, 2000; Palma, 2001).

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 (Núñez, 2018).

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 (Animal Reproduction Systems, 2007; Núñez, 2018).

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 (Dascanio & McCue, 2014; Núñez, 2018).

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 $20\mu\text{m}$ con cuatro cámaras (Leja Products, B. V., Nieuw-Venneps) y registradas por un software de análisis de movimiento (CEROS Hamilton Thorne Inc Thorne Biosciences).



Figura 6. Laboratorio de Procesamiento de Semen del Club Hípico la Silla, Monterrey, Nuevo León.

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.

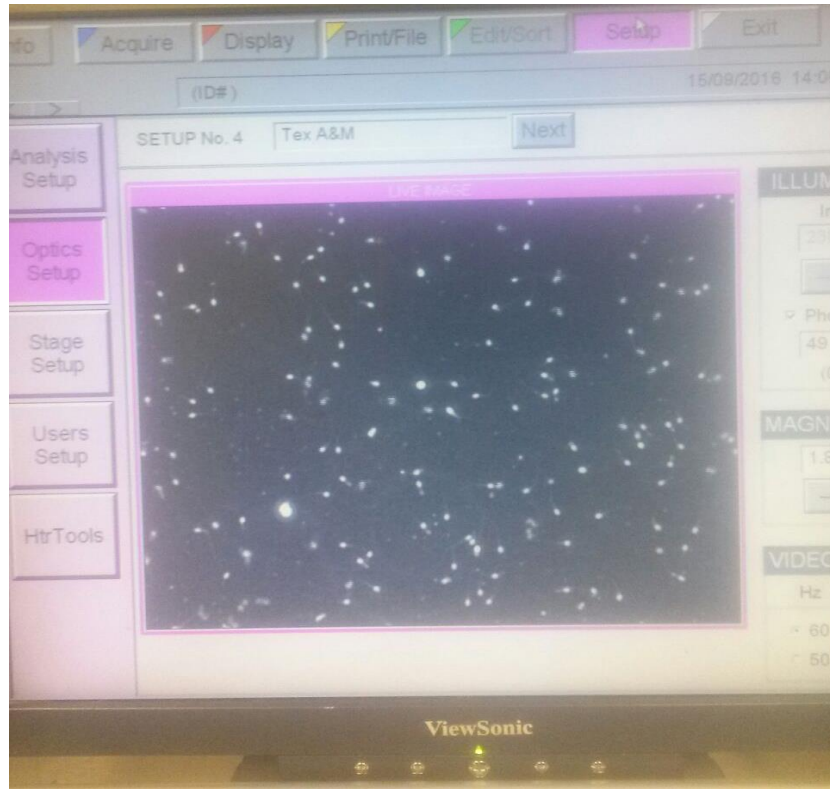


Figura 7. Sistema de análisis computarizado (CASA).

El análisis de los datos se realizó obteniendo las medias de los mismos, se utilizó una prueba de comparación de medias y se contrastaron mediante una prueba T, utilizando el programa estadístico R i386 versión 3.4.3.

RESULTADOS

El estudio evaluó la motilidad espermática post descongelación en semen equino, en dos medios comerciales (Mexicano y Brasileño) en garañones de raza cuarto de milla, ubicados en dos localidades en Mexicali y Ensenada, el semen fue colectado con vagina artificial, parte de los contenidos seminales centrifugados se mezclaron con los dos crioprotectores, se estabilizó por 60 min, se envasó en pajillas de 0.5 cc y se congela en vapores de nitrógeno por 20 minutos, las pajillas se llevaron al laboratorio de Andrología de la Silla en el estado de Nuevo León y por medio del sistema C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Análisis) se evaluaron los parámetros: motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidad lineal media (VAP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH), frecuencia de batida de la cabeza del espermatozoide (BCF), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), datos fueron analizados por medio del procedimiento R; el mejor índice de motilidad fue (BCF) mostrando diferencia significativa tanto para el crioprotector Mexicano y Brasileño, durante todas las épocas del año con excepción del invierno con el crioprotector Mexicano, para los garañones ubicados en Ensenada, parámetros como VAP, VSL, LIN se observó diferencia significativa solo durante la primavera con el crioprotector Brasileño, también para los caballos ubicados en Ensenada, en los parámetros MT, MP y BCF se observó diferencia significativa a favor de Mexicali pero no durante todas las temporadas, y para los parámetros VCL y STR no se mostró diferencia significativa para ninguna estación ni crioprotector, se analizaron también los datos indistintamente a la ubicación y estación del año, mostrando una diferencia muy altamente significativa ($P=<0.001$) con el crioprotector Brasileño los parámetros de MT, MP, VAP, VSL, VCL.

Tabla 2. Motilidad total de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	25.88	21.98	0.005	28.65	22.83	0.001
PRIMAVERA	25.94	26.26	0.07	28.18	25.23	0.05
VERANO	18.50	18.87	0.8	21.48	20.65	0.6
OTOÑO	21.47	18.95	0.1	25.95	22.29	0.12

Motilidad total fue igual para los dos crioprotectores y grupo de garañones, solo en invierno se observó diferencia significativa en el grupo de garañones de Ensenada 25.88% (0.005) y Mexicali 28.65% (P= 0.001).

Tabla 3. Motilidad progresiva de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	19.33	15.51	0.0003	22.01	17.08	0.001
PRIMAVERA	18.81	16.44	0.03	20.37	18.42	0.09
VERANO	12.51	12.75	0.8	15.06	14.34	0.6
OTOÑO	15.52	12.88	0.04	19.76	16.1358	0.05

Motilidad progresiva, se observó diferencia significativa en el invierno con el grupo de garañones de Mexicali con el crioprotector mexicano 19.33% (0.0003) y Mexicali con el crioprotector Brasileño 22.01% (P= 0.001), durante la primavera el grupo de garañones de Mexicali con el crioprotector mexicano 18.81% (0.03) y Mexicali con el crioprotector Brasileño 20.37% (P= 0.09), en el otoño el grupo de garañones de Mexicali con el crioprotector mexicano 15.52% (0.04) y Mexicali con el crioprotector Brasileño 19.76% (P= 0.05) y solo durante el verano no se observaron diferencias significativas.

Tabla 4. Velocidad media de trayectoria (VAP) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	70.4	70.63	0.9	73.54	75.32	0.3
PRIMAVERA	66.97	68.14	0.5	67.81	73.56	0.003
VERANO	58.58	60.32	0.29	59.68	61.24	0.3
OTOÑO	63.5	63.34	0.89	65.02	65.11	0.9

La velocidad media de trayectoria, no mostro diferencia ni en la estación de año, ni por la ubicación de los sementales para el crioprotector mexicano y solo se observó diferencia estadística significativa ($P= 0.003$) para el crioprotector Brasileño en caballos ubicados en Ensenada durante la primavera (73.56%)

Tabla 5. Velocidad Lineal (VSL) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	55.65	54.55	0.44	57.39	58.92	0.3
PRIMAVERA	52.47	53.25	0.55	52.84	57.14	0.002
VERANO	44.55	47.00	0.08	45.76	47.48	0.27
OTOÑO	49.58	49.99	0.76	51.13	51.54	0.80

La Velocidad Lineal (VSL) fue igual para los dos crioprotectores y grupo de garañones, solo en primavera se observó diferencia significativa en el Brasileño en el grupo de garañones ubicados en Ensenada 57.14% ($p= 0.002$).

Tabla 6. Velocidad Curvilínea (VCL) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	136.10	133.88	0.53	139.41	140.12	0.83
PRIMAVERA	130.44	129.25	0.71	132.16	136.69	0.18
VERANO	115.38	115.98	0.83	119.18	119.01	0.95
OTOÑO	120.11	117.20	0.29	122.49	122.06	0.87

En Velocidad curvilínea (VCL) no se observaron diferencias significativas para ninguno de los grupos de garañones.

Tabla 7. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) ($\mu\text{m/s}$) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	6.32	6.11	0.16	6.27	6.07	0.14
PRIMAVERA	6.43	6.08	0.008	6.47	6.13	0.019
VERANO	6.09	5.79	0.02	6.2	5.8	0.009
OTOÑO	5.95	5.75	0.07	5.94	5.71	0.03

Amplitud de movimiento lateral de la cabeza espermática (ALH) durante el invierno con ambos crioprotectores y otoño con el crioprotector mexicano no se observó diferencia, en el otoño con el crioprotector brasileño se observó diferencia significativa ($P=0.03$), durante la primavera se observó diferencia significativa con el crioprotector mexicano 6.43 ($P=0.008$) tanto para el crioprotector Brasileño 6.47 ($P=0.019$) para el grupo de garañones ubicados Mexicali y durante el verano también se observó diferencia significativa con el crioprotector mexicano 6.09 ($P=0.02$) y para el Brasileño 6.2 ($P=0.009$) para el grupo de garañones ubicados Mexicali.

Tabla 8. Frecuencia de Batida (BCF) (Hz) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	35.34	35.90	0.4	34.92	37.17	2.24E-06
PRIMAVERA	33.15	35.30	7.02E-09	33.77	35.48	2.26E-05
VERANO	32.56	33.75	0.02	32.60	34.14	0.002
OTOÑO	32.18	34.56	1.16E-07	33.02	34.54	0.012

En la Frecuencia de batida BCF se observaron resultados altamente significantes en todas las temporadas para los caballos ubicados en Ensenada, excepto en invierno con el crioprotector Mexicano (valor $P=0.4$) para los caballos ubicados en Ensenada (35.90)

Tabla 9. Índice de Rectitud (STR) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año (VSL/VAP)*100.						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	76.66	75.25	0.13	76.71	76.51	0.84
PRIMAVERA	75.82	75.76	0.94	74.51	76.02	0.11
VERANO	74.10	74.97	0.38	74.26	74.19	0.94
OTOÑO	76.15	75.82	0.68	76.36	76.64	0.77

El índice de rectitud, en los movimientos de los espermatozoides, no mostro diferencia estadística significativa cuando se consideró el efecto de crio protector, época del año y la ubicación de los garañones ($P>0.05$).

Tabla 10. Índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides de equinos ubicados en Mexicali y Ensenada en distintas estaciones del año.(VSL/VCL)*100						
ESTACIÓN DEL AÑO	CRIOPROTECTOR MEXICANO			CRIOPROTECTOR BRASILEÑO		
	MEXICALI	ENSENADA	V.P	MEXICALI	ENSENADA	V.P
INVIERNO	42.00	40.83	0.14	42.45	42.48	0.96
PRIMAVERA	40.84	41.28	0.47	40.28	41.94	0.02
VERANO	40.05	40.27	0.83	39.51	40.18	0.45
OTOÑO	43.25	42.55	0.37	43.36	42.32	0.23

Índice de linealidad LIN, no mostro diferencias estadística significativas cuando se consideró el efecto de crio protector y la ubicación de los garañones, solo se observó diferencia significativa ($p=0.02$) en primavera para el crioprotector Brasileño de los garañones ubicados en Ensenada (41.94%).

Tabla 11. Evaluación de todos los parámetros considerando solo el efecto de los diferentes crioprotectores.			
Parámetros	Crioprotector Mexicano	Crioprotector Brasileño	Valor P
MT	21.73875	24.26629	9.38E-05
MP	15.35246	17.7635	1.53E-06
VAP	65.07877	67.53073	0.0005297
VSL	50.76778	52.61341	0.001029
VCL	124.3335	128.4223	0.0007529
ALH	6.0527	6.065736	0.7848
BCF	34.11527	34.45829	0.07967
STR	75.5419	75.64991	0.7428
LIN	41.38547	41.55121	0.5572

Estadísticamente distintas, es mayor estadísticamente la motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidad media de trayectoria(VAP), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad curvilínea (VCL) con el crioprotector Brasileño

que con el Mexicano y los parámetros restantes no se observó diferencia significativa.

CONCLUSIONES

En lo referente a motilidad total y progresiva se observó que fueron favorecidos el grupo de garañones ubicados en Mexicali, se observó que los parámetros que están directamente asociados con la fertilidad en el caballo se ven mayormente afectados durante el verano independientemente del crioprotector y ubicación de los sementales, observándose que mejoran durante la primavera, al considerar la ubicación de los garañones estos mismos se vieron favorecidos para los caballos ubicados en Ensenada estadísticamente. Sin embargo, numéricamente no son tan discrepantes las diferencias entre ambos grupos de caballos, por lo que podemos decir que caballos ubicados en Mexicali es también factible trabajarlos con fines reproductivos en la congelación de semen durante todas las épocas del año, cuando se evaluó solo el uso de los diferentes crioprotectores se observó una diferencia significativa en la mayoría de las variables para el crioprotector Brasileño, presentando una menor disminución en los parámetros comparado con el crioprotector Mexicano, sin embargo numéricamente no son muy diferentes por lo que se puede recomendar el uso de ambos crioprotectores bajo las mismas condiciones que se realizó este experimento, durante cualquier época del año tanto en Ensenada como en Mexicali.

LITERATURA CITADA

- Aisen, E.G. 2004. *Reproduccion Ovina y Caprina*. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina.
- Amann, R.P. 2008. The Cycle of the Seminiferous Review Epithelium in Humans: A Need to Revisit?. *Journal of Androl.* (29) 5. Pp.469–487. DOI:[10.2164/jandrol.107.004655](https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004655)
- Animal Reproduction Systems. 2007.instruction Manual model 591b densimeter, Dupree Inc. Chino, CA.
- Arenas, E., A. Cambrón, D. Ambríz , P. Zúñiga, A. Rodríguez, y A. Rosado. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. 5-11.
- Astro mia. 2019. tierra y luna. <https://www.astromia.com/tierraluna/estaciones.htm>
- Awad, M.M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa, *Animal Reproduction science* (123) 157-162, DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.01.003
- Baumber-Skaife J. 2011. Evaluation of Semen. Pages 1278–1291 in *Equine Reproduction*. 2nd ed. A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, and D.D. Varner, eds.Wiley-Blackwell, Ames, IA.
- Brinsko, S. P., T. L. Blanchard, D. D. Varner, J. Schumachar, C. C. Love, and K. Hinrichs. 2011. *Manual of Equine Reproduction*.(3ra Ed.). Mosby Elseiner.
- Brito, L. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clin Tech Equine Pract* 6:24926. doi:10.1053/j.ctep.2007.09.004
- Carleton, C.L. 2011. *Blackwell’s Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Equine Theriogenology*. (1ra Ed.). Wiley Blackwell Publishing
- Comisión Nacional del Agua. Temperatura máxima promedio a nivel nacional y por entidad federativa 2016. <https://smn.conagua.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Pron%C3%B3stico%20lim%C3%A1tico/Temperatura%20y%20Lluvia/TMAX/2016.pdf>

- Dascanio, J. y P. McCue. 2014. *Equine Reproductive Procedures*.(1ra Ed.). Wiley Blackwell.
- Diaz, N. 2010, Características del eyaculado equino y variaciones estacionales. *Ciencia y Tecnología Ganadera*. (4), 23-30
- Durán, M.C. 2007. Efecto de la inducción de ovulación con gonadotropina coriónica humana, sobre la concentración plasmática de progesterona al inicio de la preñez en yeguas fina sangre de carrera. (Tesis de Licenciatura). Universidad De Chile. Facultad De Ciencias Veterinarias Y Pecuarias Escuela De Ciencias Veterinarias.Santiago, Chile.
- Ekhlesi, M., B. Schäfer, C. Kirchhoff, O. Hess, S. Bellair, P. Müller y E. Töpfer colaboradores. 2004. Structural and Molecular Characterization of Equine Sperm-Binding Fibronectin-II Module Proteins, *Molecular Reproduction And Development* (70) 45–57
- Ekhlesi, M., B. Schäfer, C. Kirchhoff, O. Hess, S. Bellair, P. Müller y E. Töpfer.2004. Structural and Molecular Characterization of Equine Sperm-Binding Fibronectin-II Module Proteins. *Molecular Reproduction and Development*. 70. Pp.45–57 DOI 10.1002/mrd.20187
- Gączarzewicz, D. 2015. Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation. *West Pomeranian University of Technology*. Szczecin, Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*.18 (4).Pp.817–824, DOI 10.1515/pjvs-2015-0106
- Gadea J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural research*. 1 (2): pp. 17-27
- Gutiérrez L. 2014. Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid
- Hafez, E. y B. Hafez. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. McGraw-hill.
- Hernández, L., A. Nivia-Osuna, D. Hernández, J. Rubio y A. Quintero. 2013. Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Respuestas*. 18(2). Pp.16-27.
- Hoffmann, B. y A. Landeck. 1999. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science*. 57. Pp.89–98
- Holt, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53. Pp. 47-58.
- Hoogewijs M.K., S.P Devliegher, J.L.Govaere, C. Deschauer, A.Dekruif y A.Vansoom.2011.Influence of counting chamber type on CASA outcomes

- of equine semen analysis. *Equine Veterinary Journal*. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00523.x
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2017. Anuario estadístico y geográfico de Baja California 2017. https://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF_Docs/BCN_ANUARIO_PDF.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2019. <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/bc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=02>
- Johnson, L., 1991 Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol. Reprod.* 44:284.
- Johnson, L., Thompson, Jr. y Varner D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci.* DOI:10.1016/j.anireprosci.2007.11.029
- Kuisma, P., M. Andersson, E. Koskinen y T. Katila. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet. Scand.* 48:14.
- Leopold, S., J. Samper, E. Curtis, y M. Buhr. 2000. Effect of cryopreservation and oviductal cell conditioned media on Ca₂₊ flux of equine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 56. Pp.431-45.
- Lopez C., F. Crespo, F. Arroyo, J.L.Fernandez, P.Arana , S.D. Johnston y J. Gosálvez. 2007 Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion *Theriogenology* 68. Pp.1240–1250. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.029
- Macías, B., L. González, C. Ortega, C. Salazar, A. Morillo, H. Rodríguez, J.A. Tapia, D. Morcuende y F.J. Peña. 2010. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim.* (46) Pp.141-148. doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x
- Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira, y J. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 57. Pp.327-344.
- Mejía, J. E. 2017. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Cuenca, Ecuador.
- Méndez, C. 2015. Efecto de un gradiente de centrifugación sobre la calidad del semen equino, (Tesis Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Monterrey, Nuevo Leon.
- Moore, A.I., EL. Squires, JE. Bruemmer, JK. Graham. 2006. Effect of Cooling Rate and Cryoprotectant on the Cryosurvival of Equine Spermatozoa.

- Mortimer, S. y C. Jonge, 2018. CASA—Computer-Aided Sperm Analysis. Encyclopedia of Reproduction (5). Pp.59-63. doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64935-8.
- Nagy, A., T. Polichronopoulos, A. Gaspardy, L. Solt y S. Cseh. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. Department and Clinic of Reproduction. Department for Animal Breeding and Nutrition. Faculty of Veterinary Science. Szent István University. Budapest. Hungary.63 (3). Pp. 370–381. DOI: 10.1556/004.2015.035
- Núñez, L. 2018. Características espermáticas del eyaculado de caballos cuarto de milla ubicados en la zona costa pacifico norte y valle de mexicali en baja california. (Tesis de Maestría). Universidad Autonoma de Baja California. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Mexicali. Baja California. Mexico.
- Ormachea E., C. Calsin y O. Zegarra. O. 2019. Comunicación Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. Rev Inv Vet Perú. 30 (1). Pp. 500-506 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>
- Ortega, C. 2011. Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino; estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. (Tesis Doctoral). Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina.
- Ozanam, F., M. Alvarenga, J.A. Dell’acqua, G. Monteiro, Sancler-silva y C. Ramires. 2014. Manual de andrología y manipulación del semen equino. <http://botupharma.com.br/downloads/>
- Palma, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Pesch, S., H. Bostedt, K. Failing y M. Bergmann. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. Anim. Reprod. Sci. 91.Pp.285-298
- Petrunkina, A., D. Waberski, A. Günzel-Apel, y E. Töpfer-Petersen. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Reproduction. 134. Pp.3-17.
- Raz, T. y A. Raz .2012. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the mare. Israel Journal of Veterinary Medicine. 67(1).

- Restrepo, G., A. Usuga, J. Montoya, A. Celis y A. Henao. 2014. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Rev. Lasallista Investig.*
- Restrepo, G., D. Ocampo, y A. Velásquez. 2013. Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.* 16. Pp.445-450.
- Rodríguez, H., y F. Peña. 2013. Semen technologies in domestic animal specie. *Animal Frontiers.* 3 Pp.26-33.
- Rueda, F. L. 2011. Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Tesis de Maestría.
- Salgado, V. 2016. Efecto del retiro de plasma seminal en la calidad espermática de semen caprino congelado usando diferentes criopreservadores. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigaciones en Ciencias Vetrinarias. Mexicali, Baja California, México
- Sánchez, R. A. y B. D. Garrido. 2013. Evaluación de una Prueba hiposmótica simplificada en semen canino fresco y refrigerado. *Revista Científica,* XXIII. 6:506-510.
- Sieme, H., T. Schäfer, T.A.E. Stout, E. Klug y D. Waberski. 2003. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* 60. Pp.1153–1164. doi:10.1016/S0093-691X(03)00113-4.
- Tischner M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of reproduction and fertility, Abstract (27).* Pp.53-9
- Valencia, J., G. González, M. González, y A. Trejo. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Veterinaria México.* 25. Pp.127-131.
- Valverde, A. 2018. Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana.* (29) 2. Universidad de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29852>
- Valverde, A. y M. Madrigal. 2019. Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana* (30) 2. DOI: <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.34145>

- Verstegen J., M. Iguer-Ouada, y K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57. Pp.149-179
- Wernli, J. 2010. Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas. Reporte de caso: Artritis séptica en potros. Universidad de la Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tesis de Licenciatura. Bogotá. Colombia 1-71.