

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DEL EYACULADO DE CABALLOS
CUARTO DE MILLA UBICADOS EN LA ZONA COSTA PACÍFICO NORTE Y
VALLE DE MEXICALI EN BAJA CALIFORNIA**

TESIS

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

PRESENTA:

LUIS ALONSO NÚÑEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

ASESORES

Dr. RAFAEL VILLA ANGULO

Dra. OLGA MARITZA MANRIQUEZ NÚÑEZ

Dr. CARLOS VILLA ANGULO

Dr. RICARDO MORALES CARBAJAL

MEXICALI, B.C., MEXICO

ABRIL 2018

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DEL EYACULADO DE CABALLOS CUARTO DE MILLA UBICADOS EN LA ZONA COSTA PACÍFICO NORTE Y VALLE DE MEXICALI EN BAJA CALIFORNIA. Tesis presentada por Luis Alonso Núñez Rodríguez como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra

Director de tesis

Dr. Rafael Villa Angulo

Co-director de tesis

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez

Asesor

Dr. Carlos Villa Angulo

Asesor

Dr. Ricardo Morales Carbajal

Asesor

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con todo el sentimiento y extrañeza a mí querido padre Don Adolfo (Q.D.P) y a mí adorada madre Doña Elena que han sido durante mi formación un soporte infinitamente por mi apreciado así como a mi querida esposa Camelia y a mis preciosas hijas Frida y Diana.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por ayudarme a seguirme formando profesionalmente y brindarme su apoyo para formarme como Maestro en Ciencias Veterinarias.

Al CONACYT por los apoyos brindados para alcanzar mis metas en este programa de Maestría en Ciencias Veterinarias y a la coordinadora del programa de maestría Dra. Olga Maritza Manríquez N.

A mis compañeros en el trayecto de esta empresa; Alistair, Erika, Cecilia Esther.

Con gratitud a mis profesores por su dedicación, tiempo y sus conocimientos brindados especialmente a mi director de Tesis Dr. Víctor Manuel González Vizcarra.

Y un extenso a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a coronar con éxito los esfuerzos realizados para la consecución de este proyecto (Shamanta, Rogelio “cuchillo”, y al señor Gregorio).

RESUMEN

Volumen libre de gel, concentración, motilidad y anormalidades espermáticas entre otras, son indicadores de la calidad seminal desde el punto de vista de la capacidad fecundante del espermatozoide, no solamente en el caballo, en todas las especies domésticas incluyendo al hombre, estudiar las características del espermatozoide es de valor imponderable para calificar la calidad de los sementales y sus posibilidades de dispersión de su genética en el mundo o en su región, en Baja California el estudio que se realizó para evaluar la capacidad y calidad del espermatozoide de diferentes sementales de la raza cuarto de milla se planteó notando como posible discrepancia la ubicación de los sementales en la zona costera y el Valle de Mexicali, al realizar un análisis de los eyaculados de cuatro sementales situados en la zona costera y cuatro en el Valle de Mexicali encontramos que no existe diferencia en estos cuatro indicadores en los sementales ubicados, cuestión que se demuestra con las medias y desviaciones estándar de las características de estos cuatro indicadores, para esto se utilizó un análisis estadístico apoyado en el programa R i386 versión 3.4.3., obteniéndose las siguientes medias y que a continuación se muestra: Volumen libre de gel 69.3ml y 55.8ml, concentración espermática 185.9 millones/ml y 157.9 millones/ml ($P=0.27$), motilidad espermática 58.5 y 57.2 porcentaje ($P=0.86$) y anormalidades espermáticas 14.47 y 16.27 porcentaje ($P=0.31$) para Mexicali y zona costera respectivamente.

PALABRAS CLAVES: Equino, espermatozoide, concentración espermática, motilidad espermática, volumen.

ABSTRACT

Free volume of gel, concentration, motility and spermatic abnormalities among others, are indicators of seminal quality from the point of view of the fecundant capacity of sperm, not only in the horse in all domestic species including man, study the characteristics of sperm is of imponderable value to qualify the quality of the stallions and their possibilities of dispersion of their genetics in the world or in their area, in Baja California the study that was carried out to evaluate the capacity and quality of the sperm of different Quarter-horse stallions were raised noting as a possible discrepancy the location of the stallions in the coastal zone and the Mexicali Valley, when carrying out an analysis of the ejaculates of four stallions located in the coastal zone and four in the Mexicali Valley, we find that there is no difference in these four indicators in the stallions located, an issue that is demonstrated with the means and standard deviations of the characteristics of these four indicators, for this a statistical analysis supported by the program R i386 version 3.4.3., was used obtaining the following means and that is shown below: Free gel volume 69.3ml and 55.8ml, sperm concentration 185.9 million / ml and 157.9 million / ml ($P = 0.27$), sperm motility 58.5 and 57.2 percent ($P = 0.86$) and sperm abnormalities 14.47 and 16.27 percent ($P = 0.31$) for Mexicali and coastal zone respectively.

KEYWORDS: Equine, spermatozoon, sperm concentration, sperm motility, volume.

INDICE

INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS	5
Objetivo general.....	5
Objetivo específico.....	5
HIPÓTESIS	6
REVISIÓN DE LITERATURA	7
Desarrollo del espermatozoide equino.....	7
Espermatogénesis.....	7
Espermatogénesis.....	7
Espermatidogénesis.....	7
Espermiogénesis.....	8
Espermiación.....	8
Regulación de la espermatogénesis por apoptosis.....	8
Maduración espermática en el epidídimo.....	8
Estructura del espermatozoide equino.....	9
La membrana plasmática.....	9
La cromatina.....	10
El acrosoma.....	10
El segmento ecuatorial.....	10
Fosa de implantación.....	10
Pieza intermedia.....	11
Pieza principal.....	11
Pieza terminal.....	11
Fisiología espermática.....	11
Motilidad espermática.....	11
Capacitación.....	12
Reacción acrosómica.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Procedimiento de recolección.....	14
Preparación de una yegua o señuelo.....	14
Preparación de la vagina artificial.....	15
Preparación del garañón.....	15
Determinación de la concentración espermática.....	16
Determinación de la motilidad espermática.....	16
Determinación de las anomalías morfológicas.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Volumen seminal.....	18
Concentración espermática.....	18
Motilidad espermática.....	19
Morfología espermática.....	19
CONCLUSIÓN	20
LITERATURA CITADA	21

INTRODUCCION

Las evaluaciones de la fertilidad de un semental no son posibles hasta que el macho ha alcanzado su madurez sexual y es capaz de producir un eyaculado. Como los caballos son reproductores estacionales es importante saber que estación es la mejor para optimizar los procedimientos de crío preservación, incluyendo la temporada de colección, de tal manera maximizar el potencial de fertilización del esperma de una garaanón que persistirá después de la crío preservación (Wrench et al., 2010)

Los garaanones experimentan cambios fisiológicos durante la temporada no reproductiva que incluyen disminución en el tamaño testicular y disminución de la concentración de la testosterona en suero (Johnson y Thompson, 1987).

Se asume generalmente que el mejor tiempo para recolectar semen para crío preservar es en la primavera, durante la temporada reproductiva (Blottner et al., 2001; Janett et al., 2003 a, b; Magistrini et al., 1987).

Numerosos estudios han evaluado semen fresco y crío preservado para analizar variables de semen de rutina. Variación en los eyaculados presentan cambios en el esperma; como son motilidad, viabilidad e integridad de la membrana existen tanto entre sementales y dentro de sementales (Alghamdi et al., 2002; Batellier et al., 2001; Braun et al., 1994; Gebauer et al., 1976; Goolsby et al., 2004; Schembri et al., 2003; Vidament et al., 1997).

También es consistente entre los estudios la observación donde el esperma crío preservado es menos motil, menos viable y tiene menos espermatozoides con membranas intactas comparado con el esperma de eyaculados frescos (Amann y Pickett, 1987; Blottner et al., 2001; Crockett et al., 2001; Henry et al., 2002; Janett et al., 2003 a,b).

ANTECEDENTES

La inseminación artificial (IA) se practica en numerosos mamíferos, incluyendo seres humanos, especies de interés zootécnico y especies zoológicas exóticas. Tiene una larga historia iniciando con caballos árabes, sin embargo la primera inseminación se realizó en el siglo XIV. El desarrollo significativo de la técnica se produjo hasta finales del siglo XIX. La investigación se llevó a cabo principalmente en caballos y perros, siendo la primera aplicación comercial en caballos en Rusia a finales del siglo XIX. El reciente aumento del interés por la IA equina durante los últimos años ha sido un reflejo del aumento en el número de caballos, junto con el ocio en desarrollo de gente interesada en montar a caballo y la obtención de ventajas económicas de la IA (Perry, 1968).

La IA como técnica reproductiva se desarrolla de forma comercial primero en bovinos de leche en sistema intensivo a mitad del siglo pasado y a partir de esta especie se ha ido extendiendo al resto de las especies zootécnicas. Durante los últimos 15 años se inseminan más yeguas, aunque no se llegan a alcanzar los porcentajes de uso que se observan en bovinos. Sin embargo, hoy en día esta técnica reproductiva tiene una reconocida capacidad en la mejora zootécnica y en el control sanitario. La técnica es cada vez más aceptada por los ganaderos y su empleo se está extendiendo en más razas de caballos (Galina y Valencia, 2008).

La IA consiste en la colección de semen procedente de un garañón, por lo general de un valor genético superior, seguido por la introducción de ese semen en el cuerpo del útero de una hembra sexualmente receptiva en el momento de la ovulación, con el fin de dar lugar a la fertilización. La técnica tiene muchas ventajas, como el mejoramiento genético, mejor aprovechamiento del garañón, ayuda a mejorar la fertilidad, reduce el riesgo de transmisión de enfermedades, facilita los programas de selección y nos permite poder disponer de espermatozoides de buena calidad evitando riesgos, así como gastos en transporte de los sementales (Galina y Valencia, 2008).

JUSTIFICACIÓN

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

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar las características de los eyaculados de los garañones cuarto de milla de enero a junio en la zona costa pacífico norte y Valle de Mexicali, en Baja California.

Objetivos específicos

Determinar volúmenes eyaculatorios libres de gel

Determinar concentración espermática

Determinar motilidad espermática

Determinar anormalidades morfológicas

En los eyaculados de dos grupos de garañones cuarto de milla ubicados en la zona costa pacífico norte y Valle de Mexicali en Baja California.

HIPÓTESIS

No existe diferencia alguna en las características de los componentes en los eyaculados de diferentes garañones cuartos de milla en Baja California.

Hipótesis alternativa; Al menos uno de los componentes de los eyaculados en garañones cuarto de milla en Baja California presentan diferencias.

REVISIÓN DE LITERATURA

Desarrollo del espermatozoide equino

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

Espermatogénesis

Es el proceso de proliferación, maduración y diferenciación que tiene lugar en los túbulos seminíferos y mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas en las cuales, las células primordiales cambian su morfología, pierden algunas de sus organelas y se transforman en células diferenciadas.

Espermatogénesis: poco antes de llegar a la pubertad, los gonocitos germinales se diferencian a espermatogonias en esta primera etapa, las espermatogonias experimentan una serie de divisiones mitóticas para mantener su número (espermatogonias tipo A) en primer lugar, y para producir tipo B que se dividirán nuevamente, dando espermatocitos primarios, (Amann, 2008).

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

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

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

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

Regulación de la espermatogénesis por apoptosis.

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

Maduración espermática en el epidídimo

El epidídimo es el órgano de proporcionar el ambiente idóneo para la maduración final de los espermatozoides y de su almacenaje, adquiriendo de este modo la motilidad y su capacidad para fecundar. El epidídimo está constituido por un túbulo altamente replegado de epitelio pseudoestratificado compuesto por varios tipos celulares. Se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. El tiempo requerido por el

espermatozoide para ir desde la cabeza a la cola varía según la especie. En el caballo es de 9-11 días. Durante el tránsito por este órgano el espermatozoide sufre una serie de transformaciones morfológicas y funcionales que le aportan características como la motilidad y la capacidad de reconocer la zona pelucida. Una vez madurados los espermatozoides se acumulan en la cola del epidídimo hasta la eyaculación (Cornwall, 2009).

Estructura del espermatozoide equino

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

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

Parks y Lynch en 1992, se comprobó que la membrana plasmática del espermatozoide equino contiene menor porcentaje de colesterol que el de toro o el de cerdo. Esto le confiere menor tolerancia a los descensos de temperatura. La membrana plasmática consta además de una serie de proteínas integradas entre los lípidos. Estas proteínas actúan a modo de poros o canales, como receptores de unión a determinadas

estructuras del aparato genital femenino (oviducto); como zona de unión específica de membrana, o bien presentan cadenas de carbohidratos que reaccionan con proteínas del medio.

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

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

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

La pieza intermedia (PI): se caracteriza por la presencia de una doble hélice de mitocondrias. Estas organelas, además de ser las responsables del metabolismo energético y de la regulación de muerte celular, se ha comprobado recientemente que son la mayor fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno, las mitocondrias se disponen alrededor de 9 pares de fibras longitudinales denominadas “fibras densas”,

que rodean al axonema. **La pieza intermedia** queda limitada caudalmente por el anulus que es la zona donde la membrana plasmática se condensa (Koppers, 2010).

La pieza principal (PP): constituye la porción de la cola. Está formada por las 9 fibras densas y el axonema que se continúan desde la zona intermedia. Las fibras van reduciendo su tamaño hasta desaparecer al final de la PP. **La pieza terminal (PT)**: constituye la pieza final de la cola, y está formada por el axonema, sin vaina fibrosa (Hess, 1999).

Fisiología espermática

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

Motilidad espermática

La motilidad espermática es una de las características funcionales básicas del espermatozoide. Existen dos tipos de movimiento espermático, un movimiento activo, propio de los espermatozoides eyaculados y cuya finalidad es avanzar en el tracto reproductor de la hembra (Turner, 2006). Este movimiento se caracteriza por ser simétrico, progresivo y con baja amplitud de onda. El movimiento hiperactivo, es el que experimentan los espermatozoides capacitados. La batida flagelar es asimétrica y de mayor amplitud con objeto de penetrar en la membrana del ovocito (Yanagimachi, 1970). La estructura que le confiere motilidad al espermatozoide es el axonema. Este

necesita de ATP para poder realizar el movimiento de la cola. Las mitocondrias son las organelas encargadas de la producción de energía en el espermatozoide mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, su distribución se encuentra limitada al tracto intermedio. Turner y colaboradores, en el 2006, demostraron que el ATP producido en las mitocondrias era suficiente para permitir la motilidad y que el ATP tendría que difundirse hasta alcanzar la totalidad de la cola. Sin embargo, diversos estudios han comprobado que el metabolismo aeróbico no es el único que abastece de energía al espermatozoide (Escalier, 2006).

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

Capacitación

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

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

produce un aumento del calcio intracelular, de bicarbonato y de peróxido de hidrogeno, que activan la adenil ciclasa para producir AMP cíclico. El aumento de AMPc activa la proteína kinasa A (PKA), que finalmente acaba por fosforilar ciertas proteínas (Suzuki, 1988).

Reacción acrosómica

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

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

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

MATERIALES Y METODOS

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

Procedimiento de recolección

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

Preparación de una yegua o señuelo

Se prepara una yegua que se encuentre receptiva al garañón, evacuándola de contenido fecal, posteriormente lavando la región perianal de la yegua con jabón neutro y agua limpia, se hacen tres ciclos, siendo en el tercero donde se procede al secado con papel, y secando la región de la vulva en dirección de distal hacia proximal, es decir de la vulva hacia el ano, para evitar arrastre de partículas de heces hacia la vulva, y reducir el riesgo de contaminar la muestra. Una vez lista la yegua se le colocarán trabones en las patas para garantizar la seguridad en el manejo, tanto para el semental como para el personal.

Preparación de la vagina artificial

Se utilizó una vagina artificial tipo Missouri con modificación en el vaso recolector de una vagina tipo colorado, limpia, lavada previamente con jabón neutro y enjuagada con agua destilada, lubricada con gel no espermicida, estéril y con temperatura promedio de 47°C. Una de las características de la utilización de este tipo de vagina es que es más manejable que la tipo colorado, y que el eyaculado es depositado en el cono de la vagina la cual es un área fuera de donde se encuentra la temperatura elevada y previene el shock térmico, además la modificación en el vaso colector permite la utilización de micro filtros de polipropileno con poros de dimensión de 120 micras, el cual permitió obtener un volumen libre de gel.

Preparación del garañón

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

Recolección del garañón

Obtenido el eyaculado se procede a su evaluación, tomando en cuenta apariencia, volumen, motilidad, concentración, anormalidades morfológicas.

Determinación de volúmenes eyaculatorios libres de gel

El volumen libre de gel se midió utilizando cilindros de vidrio graduados con capacidad de 100 ml, obteniendo la muestra del vaso recolector y vertiendo el contenido por la pared del cilindro graduado en su totalidad y así poder cuantificar el volumen expresado en mililitros.

Determinación de la concentración espermática

La concentración espermática se determinó utilizando un densímetro 591B marca ARS, se colocaron 3.42ml de una solución de formalina al 10 % en un cubo, este a su vez fue leído por el densímetro, después de este paso se procedió a colocar 180µl de semen libre de gel en la solución que ya contenía el cubo, de nuevo el densímetro leyó la muestra y por diferencia de densidad óptica en esta muestra se obtuvo la concentración espermática expresada en millones por ml, de acuerdo a las especificaciones (Animal Reproduction Systems, 2007).

Determinación de la motilidad espermática

Para determinar la motilidad se colocaron en un vial de 2 ml una alícuota de 100µl de expansor de semen EZ Mixin previamente atemperados a 37.5 °C, agregando posteriormente a este expansor 20µl del semen libre de gel, con la finalidad de diluir la muestra para determinar con mayor precisión la motilidad espermática, se agito la alícuota gentilmente por 10 segundos, y posteriormente se tomó una muestra la cual se colocó sobre un porta objetos y se cubrió con un cubre objetos previamente atemperados a 37.5°C y se observó al microscopio (Primo Star Zeiss) bajo el objetivo 40X observando 10 campos para así determinar la motilidad expresando este resultado en porcentaje.

Determinación de las anomalías morfológicas

Se colocaron 20µl de semen libre de gel sobre un porta objetos, después se colocaron 20µl de la tinción Hancock (eosina – nigrosina), mezclando ambas porciones, posteriormente se realiza un barrido asistiéndose con otro porta objetos con la finalidad de extender la muestra uniformemente, esta impronta se dejó reposar sobre la platina térmica hasta alcanzar su desecación completa, una vez seca la muestra se observó al microscopio (Primo Star Zeis) con el objetivo de inmersión (100X) realizando el conteo de las anomalías morfológicas, expresándolas en porcentaje.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones en que fue conducido este experimento fueron explicadas utilizando análisis estadísticos asistidos por el procedimiento R i386 versión 3.4.3. haciendo un contraste de medias utilizando la prueba T.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Volumen seminal

El comportamiento del volumen eyaculatorio considerando las recolecciones realizadas de Enero a Junio, presentaron una media de $69.3 \pm \text{ml}$ y $55.8 \pm \text{ml}$ para Mexicali y Ensenada respectivamente sin diferencia significativa.

Magdi M. Waheed en el 2015 realizo un estudio encontrando volúmenes eyaculatorios de 26 ml y 31.6 ml sin diferencia significativa ($P > 0.05$), N. Wrench en el 2010 obtuvo resultados con volúmenes de $66.2 \pm 4.9 \text{ ml}$ de eyaculados sin diferencia significativa ($P > 0.05$), resultados que discrepan a los anteriores son los encontrados por, N. Cazales en el 2008 obtuvo 74.6 ml y 51.5 ml con una diferencia significativa ($P < 0.05$), F. Janett 2003 por su parte obtuvo 20.5 ml y 45 ml teniendo diferencia significativa ($P < 0.05$).

Concentración espermática

En esta variable la medida en millones/ml, se obtuvieron los siguientes concentraciones 185.9 millones/ml y 157.9 millones/ml, para Mexicali y Ensenada respectivamente ($P = 0.27 \text{ NS}$), resultados similares obtuvieron N. Wrench en el 2010 con 276.1 millones/ml, sin diferencia significativa ($P > 0.05$) N. Cazales en el 2008 obtuvo resultados de 200 millones/ml y 196 millones/ml, sin encontrar diferencia estadística ($P > 0.05$).

En los estudios reportados por Magdi M. Waheed en el 2015 encontró 153 millones/ml y 293 millones/ml ($P < 0.05$) con diferencia significativa al igual que lo observado por F. Janett en el 2003, con concentraciones de 120 millones/ml y 297 millones/ml, con una diferencia significativa ($P < 0.05$). (Animal Reproduction Systems, 2007).

Motilidad espermática

Los espermatozoides mostraron una motilidad progresiva 58.5 y 57.2 por ciento ($P=0.86$) sin diferencia significativa para Mexicali y Ensenada respectivamente con similares resultados a los encontrados por, N. Wrench en el 2010 obtuvo los siguientes resultados para motilidad progresiva 10 ($P>0.05$) sin diferencia significativa y N. Cazales en el 2008 obtuvo los siguientes resultados 65.7 y 66.2 por ciento ($P>0.05$) sin diferencia significativa.

Otros estudios mostraron ser distinto como lo podemos apreciar con los experimentos conducidos por, F. Janett en el 2003 demostró una diferencia significativa ($P<0.05$), 53.9 y 73 de motilidad progresiva y doce años más tarde por, Magdi M. Waheed en el 2015 demostró una diferencia altamente significativa ($P<0.01$) con los siguientes resultados 71 y 80 por ciento de motilidad progresiva.

Morfología espermática

Los resultados de la determinación de morfología fueron de 14.47 y 16.27 por ciento ($P=0.31$) sin diferencia para Mexicali y Ensenada respectivamente a diferencia de lo observado por, Magdi M. Waheed en el 2015, N. Wrench en el 2010, N. Cazales en el 2008 así como los encontrado por F. Janett en el 2003 con 5.0 y 5.96 por ciento ($P>0.05$), 11 y 22.3 ($P<0.05$) 21 y 42 ($P<0.05$) respectivamente.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones en que se condujo este experimento para determinar las características de cuatro de los indicadores más importantes que garantizan la fertilidad espermática en los eyaculados de los garañones cuarto de milla en Baja California, de acuerdo con el mes de recolección y ubicación geográfica (zona costa pacifico norte y Valle de Mexicali) de dos grupos de garañones, no se encontró diferencias estadísticas significativas en el volumen seminal, concentración espermática, motilidad espermática y anomalías primarias y secundarias, similares resultados fueron obtenidos por diferentes investigadores y años en otras latitudes como Brasil, Francia y la Unión Americana, como se puede apreciar en los resultados y discusión descritos ya con antelación.

Recomendación: de acuerdo con lo observado con los resultados de este experimento en las características espermáticas de los eyaculados de los garañones cuarto de milla en los meses de Enero a Junio podemos recomendar que pueden ser recolectados para usarse en procedimientos de reproducción asistida como la inseminación en fresco y/o el procesamiento para la congelación del semen y su ulterior utilización en la inseminación.

LITERATURA CITADA

- Alghamdi, A.S., Troedsson, M.H., Xue, J.L., Crabo, B.G., 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool – Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *Am. J. Vet. Res.* 63, 880-885.
- Amann, R.P., The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*, 2008 29 (5) p. 469-87.
- Angus O. McKinnon et al, 1993 *Equine Reproduction* pp 756-757.
- Animal Reproduction Systems, 2007, Instruction Manual Model 591B Densimeter, Dupree Inc., chino CA
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvom, J.M., Magistrini, M., 2001. Advance in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 181-190.
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., Torner, H., 2001. Morphological and funtional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 75-88.
- Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Preservation of ejaculated and apididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, 809-818.
- Cornwall, G.A., New insights in to epididymal biology and function. *Hum Reprod Update*, 2009. 15 (2) P.213-27.
- Crockett, E.C., Graham, J.K., Bruemmer, J.E., Squires, E.L., 2001. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post – thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 55, 793-803.
- Escalier, D., Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update*, 2006. P: 449-61.

- Franca, L.R., G.F. Avelar, and F.F. Almeida, Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 2005. 63 (2) : p. 300 – 18.
- Gadella, B.M., et al, capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2001 (3-4): P. 249-65.
- Gadella, B.M., et al, Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q*, 1999. P:142-6.
- Galina, H.C. y Valencia, J. 2008. *Reproducción de los Animales Domésticos*. Editorial Limusa. 3a Edición. 422 p.
- González Vizcarra V.V. y Nuñez Rodríguez L.A. Reunión de avances de sobre reproducción asistida en animales domésticos Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias UABC, 2015.
- Heninger, N.L., et al., Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, 2004. 62 (1 – 2) : p. 283 – 97.
- Henry, M., Snoeck, P.P.N., Cottorello, A.C.P., 2001. Post – thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58, 254-248.
- Hess, R.A., Spermatogenesis overview, in *Encyclopedia of Reproduction*, E.a.J.D.N. Knobil, Editor. 1999, Academic Press: San Diego.
- J.C. Samper et al, 2007 *Current Therapy in Equine Reproduction* pp 256.
- Janett, F., Thu, R., Bettschen, S., Burger, D., Hassin, M., 2003b. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches – Montagnes stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 77, 213-221.
- Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hassin, M., 2003a. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453-461.
- John Dascanio et al, 2014 *Equine Reproductive Procedures* pp 399-400.

- Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis Anim Reprod Sci, 2008.
- Johnson, L., Thompson, Jr., D.L., 1987. Effect of seasonal changes in leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in leydig cells and intratesticular testosterone conten in stallions. J. Reprod. Fertil. 81, 227-232.
- Koppers, AJ., M.L Garg, and R.J. Aitken stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. Free Radic Biol Med, 2010 P: 112-9.
- Lamirande, G.,P Leclerc, and C. Cagnon, Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. Mol Hum Reprod, 1997. P: 175-94.
- Levy, R. and I. Seifer- Aknin, [Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization]. Ann Biol Clin (Paris) 2001, 59 (5): P.531-45.
- Macias Garcia, B., et al., Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. Reprod Domest Anim, 2010.
- Magistrini, M., Chanteloube, P., Palmer, E., 1987. Influence of season and frecueny of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 127-221.
- Perry, E.J. 1968. The Artificial Insemination of Farm Animals. Fourth edition. Rutgers University Press. New Brunswick, pp190.
- Rick L. Cowell et al, 2002 Diagnostic Cytology and Hematology of the horse
- Rick L. Cowell et al, 2002 Diagnostic Cytology and Hematology of the horse pp191-198.
- Suzuki, M. and T. Wakabayashi, Packing of DNA in cricket sperm. A compact mode of DNA packing. J Mol Biol, 1988, P: 653-61.
- Terry L. Blanchard et al, 2003 Manual of Equine Reproduction pp154-155.
- Turner, R.M., Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. Reprod Fertil Dev, 2006, P:25-38.

- Williams, A.C. and W.C. Ford, The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl*, 2001. P: 680-95.
- Wrench, N., Pinto, C.R.F., Dix, D.J., Flowers, W.L., Farin, C.E. 2010. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 119, 219-227.
- Yanagimachi, R., The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation, *J Reprod Fertil*, 1970 P: 193-6.