



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFEECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN
ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE COLA DE EPIDÍDIMO
EQUINO A DIFERENTES
TIEMPOS *POST-MORTEM***

T E S I S

(Idónea Comunicación de Resultados)
Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Agropecuarias

P R E S E N T A:

MVZ Liz Dahani González Mendiola

COMITÉ TUTORIAL:

Director:

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Asesores:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

M.C. Jorge Antonio González Santos

Ciudad de México a 18 de Abril del 2017

MIEMBROS DE COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
avalosr@correo.xoc.uam.mx

Asesores

Dr. José Antonio Herrera Barragán
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
jherrerab@correo.xoc.uam.mx

M.C. Jorge Antonio González Santos

enkhel@hotmail.com

El jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada:

“EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE COLA DE EPIDÍDIMO EQUINO A DIFERENTES TIEMPOS *POST-MORTEM*”, que presentó:

MVZ Liz Dahani González Mendiola

El día 18 de abril del 2017

JURADO DE EXAMEN

Dra. Edith Arenas Ríos
Presidenta

Dr. José Antonio Herrera Barragán
Secretario

Dr. Germán Lombardero Goldaracena
Vocal

DEDICATORIA

A mi mejor amigo y compañero de vida, mi esposo, al que amo con todo mi ser, gracias Alex por estar incondicionalmente en mis proyectos y por ser mi motivo de inspiración, por tus grandes charlas que me ayudan a poner los pies en la tierra y que me impulsan día con día, por preocuparte por mi e incluso por regañarme para que comiera, estudiara, trabajara y terminara mi tesis, sin ti esto no hubiera sido posible, te amo y siempre te amaré, esto es para ti.

A esos pequeños peludos que aguantaron horas de ayuno y aburrimiento sin jamás separarse de mí mientras yo tecleaba sin parar, por darme serenidad y un respiro cuando lo necesitaba.

A mi hermana Jenny, gracias por estar aquí, por emocionarte y preocuparte, por ponerme antes que a ti en tus preocupaciones, por transmitirme vida y risa, por ser tú.

A mi familia, esas personas que me adoptaron como parte de sus vidas y que cada logro mío lo hacen suyo, que me festejan y me apoyan, los quiero a todos, gracias Teresa Morales, gracias familia Espinosa-Morales.

Y por supuesto a mis asesores, gracias por su acto de Fe para conmigo, sin conocerme creyeron en mí y se esforzaron por hacerme sentir parte de su equipo, gracias por la oportunidad.

AGRADECIMIENTOS

El programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (PNPC) y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Ésta tesis fue apoyada por la UAM-Xoc, mediante la beca de Apoyo para alumnos de Posgrado, correspondiente al acuerdo 02/2016-2017 del Rector General; así como también por la beca otorgada por el CONACyT con número de becario CVU/becario 685734/578470.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, bajo la dirección del Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez.

A mi director de tesis el Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez y a mis asesores el Dr. José Antonio Herrera Barragán y M. en C. Jorge Antonio González Santos, así como a mis profesores la Dra. María Guadalupe Prado Flores, Dr. Adolfo Guadalupe Álvarez Macías, M en C. Reyes López Ordaz, Dr. Jesús Alberto Guevara González y a la Dra. Marcela Vergara Onofre por su orientación, comentarios y sugerencias que fueron tan acertados y oportunos para la realización de éste escrito.

Un especial agradecimiento a la Dra. Edith Arenas Ríos que tan oportunamente me ayudó a corregir y mejorar mi tesis.

Índice

RESUMEN	X
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1.MARCO DE REFERENCIA	3
1.1 EVOLUCIÓN Y DOMESTICACIÓN DEL CABALLO	3
1.2 USO DE BIOTECNOLOGÍAS	3
1.2.1 <i>Uso actual de los espermatozoides criopreservados de equino</i>	4
1.2.1.1 Uso de espermatozoides epididimarios.....	5
CAPÍTULO 2.MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 ASPECTOS REPRODUCTIVOS EN EL MACHO EQUINO	7
2.2 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA.....	7
2.2.1 <i>Gametogénesis</i>	7
2.2.2 <i>Morfología espermática</i>	8
2.2.2.1 Composición membranal.....	10
2.2.2.1.1 Proteínas.....	10
2.2.2.1.2 Lípidos.....	10
2.2.2.1.3 Glicocáliz.....	11
2.2.3 <i>Morfofisiología del Epidídimo</i>	11
2.2.3.1 Maduración del espermatozoide.....	12
2.2.4 <i>Procesos de capacitación y reacción acrosomal</i>	13
2.2.4.1 Capacitación espermática.....	13
2.2.4.2 Reacción acrosomal.....	16
2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS EQUINOS	18
2.3.1 <i>Técnicas de obtención de espermatozoides utilizadas en equinos</i>	20
2.3.1.1 Vagina artificial	20
2.3.1.2 Electroeyaculación.....	20
2.3.1.3 Recuperación post-mortem.....	20
2.3.2 <i>Proceso de criopreservación</i>	21
2.3.2.1 Daños durante la criopreservación de espermatozoides	23
2.4 EFICIENCIA DE ESPERMATOZOIDEOS EPIDIDIMARIOS.....	24
CAPÍTULO 3.METODOLOGÍA.....	25
3.1 HIPÓTESIS.....	25
3.2 OBJETIVOS.....	25
3.2.1 <i>General</i>	25
3.2.2 <i>Específicos</i>	25
3.3 MATERIALES Y MÉTODO	26
3.3.1 <i>Material biológico</i>	26
3.3.1.1 Animales	26
3.3.1.2 Ubicación	26
3.3.1.3 Obtención y transporte del material biológico.....	27
3.3.2 <i>Recuperación de espermatozoides epididimarios</i>	27
3.3.3 <i>Evaluación espermática básica</i>	27
3.3.3.1 Movilidad total y progresiva	28
3.3.3.2 Viabilidad	28
3.3.3.3 Morfología	28
3.3.3.4 Concentración espermática	28
3.3.4 <i>Evaluación de la actividad de calcio</i>	29
3.3.5 <i>Evaluación de la distribución de ácido siálico, N-acetilglucosamina y residuos de manosa y galactosa en la membrana espermática</i>	30
3.3.6 <i>Proceso de criopreservación</i>	30

3.3.7	<i>Análisis estadístico</i>	30
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	32
CAPÍTULO 4	RESULTADOS	33
4.1	EVALUACIÓN ESPERMÁTICA BÁSICA	33
4.1.1	<i>Movilidad total y progresiva</i>	33
4.1.2	<i>Espermatozoides vivos</i>	35
4.1.3	<i>Morfología espermática</i>	36
4.2	ACTIVIDAD DE CALCIO	39
4.3	DISTRIBUCIÓN DE CARBOHIDRATOS MEMBRANALES.....	42
4.3.1	<i>Residuos de manosa y galactosa</i>	42
4.3.2	<i>Ácido siálico y N-acetilglucosamina</i>	45
CAPÍTULO 5	DISCUSIÓN	48
5.1	CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS BÁSICAS	49
5.2	ACTIVIDAD DE CALCIO	55
5.3	CARBOHIDRATOS MEMBRANALES.....	59
5.3.1	<i>Manosa y Galactosa</i>	60
5.3.2	<i>Ácido siálico y N-acetilglucosamina</i>	62
CAPÍTULO 6	CONCLUSIONES	65
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Uso mundial de biotecnologías por región</i>	4
Cuadro 2. <i>Composición del medio base EDTA glucosa</i>	27
Cuadro 3. <i>Peso post-mortem promedio (g) de testículo, epidídimo y cola epididimaria equinos</i>	33
Cuadro 4. <i>Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimarios los equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.</i>	35
Cuadro 5. <i>Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimales epididimarios equinos Postcriopreservados, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF, a diferentes horas post-mortem.</i>	35
Cuadro 6. <i>Media porcentual (\pm EE) de la morfología de espermatozoides epididimales epididimarios equinos frescos a diferentes tiempos post-mortem, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA.</i>	36
Cuadro 7. <i>Media porcentual (\pm EE) de la morfología de espermatozoides epididimales epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes tiempos post-mortem, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.</i>	37
Cuadro 8. <i>Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de patrones de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem</i>	40
Cuadro 9. <i>Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de patrones de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas post-mortem diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.</i>	40
Cuadro 10. <i>Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina Pisum Sativum agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (PSA-FITC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.</i>	43
Cuadro 11. <i>Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina Pisum Sativum agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (PSA-FITC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas post-mortem, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.</i>	43
Cuadro 12. <i>Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina Triticum vulgare agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (WGA-FITC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.</i>	46
Cuadro 13. <i>Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina Triticum vulgare agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (WGA-FITC) en espermatozoides epididimales epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas post-mortem, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF</i>	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del espermatozoide equino.....	9
Figura 2. Secuencia del proceso de capacitación espermática.	15
Figura 3. Secuencia de la reacción acrosomal inducida por zona pelúcida (ZP) y progesterona.....	17
Figura 4. Gráfico de la movilidad total y progresiva de espermatozoides epididimales equinos a diferentes horas postmortem en fresco y después del proceso de criopreservación.	34
Figura 5. Gráfico del porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos de epidídimo a diferentes horas postmortem antes y después del proceso de criopreservación.	36
Figura 6. Patrones de fluorescencia con CTC en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas post-mortem.	39
Figura 7. Gráfico del porcentaje de frecuencia de los patrones fluorescentes encontrados en espermatozoides epididimales equinos a diferentes tiempos postmortem marcados con CTC antes y después del proceso de criopreservación.	41
Figura 8 Patrones de fluorescencia con PSA-FITC en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas post-mortem.	42
Figura 9. Gráfico de frecuencia (%) de los patrones de fluorescencia con lectina PSA-FICT en espermatozoides epididimales equinos obtenidos a diferentes horas postmortem, antes y después del proceso de criopreservación.....	44
Figura 10 Patrones de fluorescencia con WGA-FITC en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas post-mortem.....	45
Figura 11. Gráfico de frecuencia (%) de los patrones de fluorescencia con lectina WGA-FICT en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas postmortem, antes y después del proceso de criopreservación.....	47

RESUMEN

Las técnicas de reproducción asistida se han convertido en una importante y moderna herramienta que contribuye a los avances de la producción de equinos, logrando mantener la calidad en el semen y la preservación de germoplasma aún después de la muerte del animal con la utilización de espermatozoides obtenidos del epidídimo, por lo que en la actualidad la demanda de semen equino criopreservado ha ido en aumento y ha provocado una búsqueda por entender los cambios espermáticos durante este proceso y así mejorar las técnicas de preservación como en otras especies se ha hecho. El objetivo del presente trabajo fue describir el efecto del almacenamiento *post-mortem* en espermatozoides epididimarios en fresco y criopreservados en la presencia y distribución de carbohidratos membranales y calcio. Para las evaluaciones se utilizó Clortetraciclina (CTC) como marcador fluorescente para observar la presencia y distribución de calcio, y dos lectinas *Pisum Sativum* aglutinina (PSA) específica para residuos de manosa y galactosa y *Triticum Vulgaris* aglutinina (WGA) específica de ácido siálico y N-acetilglucosamina, ambas conjugadas a isotiocinato de fluoresceína, todas las observaciones se realizaron con microscopía de fluorescencia. Se concluyó que el tiempo de almacenamiento *post-mortem* modifica la presencia y distribución de carbohidratos membranales y calcio en los espermatozoides equinos obtenidos de epidídimo tanto en fresco como después del proceso de criopreservación. Con evidente pérdida de sitios de unión a calcio y residuos de manosa y galactosa en la cabeza espermática y movilización de carbohidratos como el ácido siálico y N-acetilglucosamina a regiones del acrosoma a mayor tiempo de conservación en refrigeración y a regiones del postacrosoma después del proceso de criopreservación. Los resultados muestran que es posible obtener espermatozoides epididimarios con características viables para inseminar a las 72 horas *post-mortem*.

SUMMARY

Assisted reproduction technology have become an important and modern tool that contributes to the advances of the production of equines, being able to maintain the quality in the semen and the germplasm preservation after the death with the use of epididymal sperm, nowadays, the demand for cryopreserved equine sperm has been increasing, consequently many researches have been development to understand the changes during this process on the spermatozoa and improve this preservation techniques like in other species has been done. The present study was undertaken to evaluate the effect of *post-mortem* storage time on presence and distribution of membranal carbohydrates and calcium in fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. Chlortetracycline (CTC) was used as a fluorescent marker to observe the presence and distribution of calcium, and two lectins: *Pisum Sativum* agglutinin (PSA) specific for mannose and galactose residues and *Tritium Vulgaris* agglutinin (WGA) specific for cialic acid and N-acetylglucosamine, both conjugated to fluorescein isothiocyanate. In conclusion, the *post-mortem* storage time modifies the presence and distribution of membrane carbohydrates and calcium in epididymal equine spermatozoa, both in fresh and after the cryopreservation process. With evident loss of calcium binding sites and residues of mannose and galactose in the spermatic head and mobilization of carbohydrates such as cialic acid and N-acetylglucosamine to regions of the acrosome to a longer time of conservation *post-mortem* and to postacrosome regions after the process of cryopreservation. The results show that it is possible to obtain epididymal spermatozoa with viable characteristics to inseminate at 72 hours *post-mortem*.

INTRODUCCIÓN

El equino ha sido utilizado desde tiempos ancestrales como alimento, medio de carga, transporte y para el manejo de ganado, pero sobre todo para deporte y entretenimiento, volviéndolo un animal de élite. A pesar de estas demandas, en equinos no se cuenta con estrategias de reproducción para mejorar su producción y reproducción (Financiera Rural, 2012), y aunque la criopreservación de semen es una estrategia eficiente para la preservación del germoplasma, solo se limita a resguardar semen de bovinos, ovinos y caprinos con alto valor productivo y genético, en equinos solo es utilizada para explotaciones universitarias y gubernamentales (Toscano *et al.*, 2014, FAO, 2010a). La crianza y reproducción de caballos se da en sectores privados (FAO, 2010a) enfocados a animales de carreras y recreación, aun así, no se cuenta con estrategias y/o centros de reproducción en esta especie, ni bancos de germoplasma (Financiera Rural, 2012). Además, los criadores solo han aceptado el uso de biotecnologías en reproducción equina de forma reciente (Pojprasath *et al.*, 2011), mas, sigue existiendo renuencia a la criopreservación de semen no sólo por los costos, sino por los múltiples eventos que complican el manejo de éstos, como la recolección de semen, la variabilidad en los rangos de gestaciones y viabilidad de espermatozoides equinos post-descongelados (Olaciregui *et al.*, 2014, Pojprasath *et al.*, 2011).

Todo evento en el equino que haga imposible una recolección de semen puede terminar con su vida reproductiva (Olaciregui *et al.*, 2014). Sin embargo, existe una biotecnología que nos permite obtener espermatozoides después de una muerte repentina por diferentes causas (natural o accidental) o incluso al ser castrados debido a su fin zootécnico: obtención de espermatozoides del epidídimo (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011, Tartaglione *et al.*, 2009, Papa *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004, James *et al.*, 2002), que ha mostrado ser un recurso accesible para éste objetivo pues en la cabeza del epidídimo se encuentra una cantidad significativa de células viables que pueden ser utilizadas para la fertilización (Bruemmer *et al.*, 2002a) además, la obtención de éstos con gestaciones exitosas ha sido reportada en varias especies además del equino y se ha demostrado fertilidad después de su criopreservación (Hernández *et al.*, 2012, Papa *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004, Bruemmer *et al.*, 2002a, James *et al.*, 2002). Pero, es conocido que el proceso de criopreservación provoca daños irreversibles en los espermatozoides equinos y no más del 50% sobrevive a éste proceso o su capacidad fertilizante disminuye (Hernández *et al.*, 2012, Pojprasath *et al.*, 2011), pues durante el proceso de dilución, refrigeración, congelación y descongelación, quedan afectadas la membranas biológicas (Pojprasath *et al.*, 2011).

Por lo que en general incluso a nivel mundial las investigaciones en reproducción equina en machos se están encaminando a entender la fisiología espermática equina para poder crear protocolos de obtención y preservación de gametos, y así quizás, poder reducir los altos costos de este procedimiento y la gran variabilidad en los rangos de gestación. Sin embargo, son pocas las investigaciones que van dirigidas a saber la habilidad de supervivencia de espermatozoides epididimarios equinos que son refrigerados en diferentes periodos de tiempo, características que están presentes en la transportación de material biológico a centros de reproducción (Bruemmer *et al.*, 2002a).

Por lo que evaluar el efecto de la criopreservación en espermatozoides epididimarios a diferentes tiempos *post-mortem*, puede darnos una “ventana de oportunidad” para crear protocolos necesarios para programas de asistencia reproductiva en equinos domésticos y en peligro de extinción.

CAPÍTULO 1. MARCO DE REFERENCIA

1.1 Evolución y domesticación del caballo

El *Equus caballus*, término científico para el caballo actual pertenece al reino Animalia, clase Mammalia, orden perissodactyla, de la familia *Equidae* (Evans *et al.*, 1990) y puede ser trazado 60 millones de años atrás por el descubrimiento de fósiles de la época geológica Eoceno, (Thiffault y Lewis, 1974). Periodo por el que los naturalistas los bautizaron con el nombre de *eohippus* (Durán, 2011, Arita, 2010).

Tal vez nunca se sepa con certeza que pueblo fue el primero en domesticar al caballo salvaje, pero si se puede afirmar que cuando los hombres prehistóricos comenzaron a tener animales domésticos, el caballo fue una de las primeras opciones (Durán, 2011) por ser útiles para el trabajo, alimentación y además el uso de sus productos sirvió para protegerse de las inclemencias del tiempo, pero fue su particularidad en el trabajo lo que hizo que el caballo fuera domesticado en las distintas faenas de arrastre, carga y montura (Deraga, 2007, Fraustro, 1989).

Desde su domesticación los usos que se le han dado al caballo han sido diversos y algunos persisten hasta nuestros días como el consumo de su carne debido a los buenos rendimientos que presenta y por ser una buena alternativa nutricional; los subproductos para la fabricación de resistoles, utensilios y/o telas continúan siendo de utilidad y a pesar de que las máquinas de motor han desplazado el uso de éste como transporte y herramienta de trabajo, estos fines zootécnicos aún no están extintos en nuestra sociedad (Palomar, 2014, Durán, 2011, Deraga, 2007, Levy y Rodríguez, 1993, Fraustro, 1989).

1.2 Uso de biotecnologías

En los últimos años las biotecnologías han progresado considerablemente en los ámbitos de cría, reproducción y genética molecular. Entre las tecnologías reproductivas, la inseminación artificial (IA) y la ovulación múltiple y trasplante de embriones, ya han tenido un impacto notable en los programas de mejoramiento del ganado en los países desarrollados. Estas tecnologías aceleran el progreso genético, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades e incrementan el número de animales que pueden criarse a partir de un progenitor superior (FAO, 2010b).

Actualmente el uso de la conservación de células vivas mediante la congelación, ha traído nuevos retos a la medicina veterinaria, con la finalidad de mejorar la supervivencia celular durante el proceso de colección, congelación, almacenamiento y descongelación, ya

que es bien sabido que durante estos pasos, un porcentaje alto de las células mueren, debido a los cambios de temperatura, presión osmótica, pH, luz y medio ambiente (García, 2012).

En numerosos países el semen se importa de ultramar y el uso de esta tecnología es más común en el sector lácteo, en América Latina se tienen datos de que 95% de los países que la integran utilizan inseminación artificial, siendo la biotecnología más usada (Cuadro 1). En numerosos sistemas en pequeña escala o de bajos insumos externos el uso de biotecnología es muy limitada. En lo concerniente a los proveedores de servicios de IA, el sector privado desempeña una función importante en esta región, y sobre todo, el uso de las biotecnologías suele ser mucho mayor en el ganado bovino que en todas las otras especies (FAO, 2010a).

Cuadro 1. Uso mundial de biotecnologías por región

Región	IN	Inseminación artificial		Trasplante de embriones		Tecnología genética molecular	
		PPI	PET	PPI	PET	PPI	EET
Europa y el Cáucaso	39	39	97%	25	64%	29	83%
África	42	42	74%	30	17%	29	14%
Asia	25	22	86%	17	47%	16	50%
América Latina y el Caribe	22	22	95%	14	86%	15	73%
Pacífico sudoccidental	11	11	55%	10	10%	9	11%
América del norte	2	2	100%	2	100%	2	100%
Cercano y Medio Oriente	7	6	100%	3	33%	5	40%

Puede observarse que la inseminación artificial (IA) es, con mucho, la biotecnología más usada. Sin embargo, especialmente en las regiones de África y el Pacífico sudoccidental, existen numerosos países en los que todavía no está disponible. IN: países inscritos al programa de informes internacionales ante la FAO. PPI: N° de países que proporcionan información. PET: Proporción de países que emplean la tecnología. Fuente FAO, 2010

1.2.1 Uso actual de los espermatozoides criopreservados de equino

Actualmente los criadores de equinos han tenido renuencia a la criopreservación de semen debido a las complicaciones de manejo al momento de obtener semen para conservarlo y por los altos costos de éste procedimiento, pues, en México no se cuenta con estrategias y/o centros de reproducción en equinos, ni bancos de germoplasma (Financiera Rural, 2012). A pesar de tener la normativa adecuada y los condicionamientos para establecer centros de procesamiento de semen (CEPROSEM), en nuestro país solo hay tres de estos sitios: el hospital de equinos de la Universidad Autónoma del Estado de México; la clínica “Las Piedras” en Jalisco, Guadalajara y el club hípico “La Silla” en Monterrey, Nuevo León. Por lo que el control del manejo del semen equino es meramente privado, los costos de éste, dependen de los registros que se tengan del donador y sus triunfos o ganancias económicas en una variedad de competencias (Pineda, 2014, Dosh, 2013).

También se ha observado una gran variabilidad en los rangos de gestación y viabilidad post-descongelación; tanto, que se ha estimado que solo cerca del 20% de los

caballos producen espermatozoides aptos para congelarse, el 60% produce células con características aceptables y el otro 20% consiste en individuos con gametos pobres de características para ser criopreservados (Pojprasath *et al.*, 2011). Es así como los protocolos de inseminación artificial en equinos con semen congelado se han vuelto tan variables (Pojprasath *et al.*, 2011, Clulow *et al.*, 2008).

Si bien las desventajas del manejo de los caballos para obtener el semen puede continuar, éste se podría convertir en un evento único que puede no volverse a repetir al conservar espermatozoides en criopreservación (García, 2012). Pero una de las grandes ventajas es el no requerir transporte de animales, pues no solo es un evento estresante para los caballos, es además un proceso que requiere trámites aduanales en ocasiones engorrosos y que al no cumplirse podrían llevar al fracaso del traslado o al sacrificio del animal en el país receptor (García, 2012, SAGARPA y Senasica, 2011, USDA, 2012).

Adicionalmente, la inseminación con espermatozoides criopreservados facilita los procesos de selección y mejoramiento, además de que, aumenta el potencial reproductivo de cada semental, pudiendo fecundar a varias hembras con espermatozoides de un solo macho. También otra gran ventaja es la reducción de la respuesta inflamatoria post-monta, frecuente en la hembra y causante de altas tasas de falla en la fertilidad por involución inflamatoria tardía y además se reduce el riesgo de transmisión de enfermedades (James *et al.*, 2002).

Pero quizás, una de las ventajas más importantes es que, no hay pérdidas reproductivas por castración o muerte; pues todo evento en el equino que haga imposible una recolección de semen, puede terminar con su vida reproductiva (Olaciregui *et al.*, 2014), así que, la posibilidad de una última recolección de gametos, obtenidos de machos genéticamente valiosos, muertos súbitamente por diferentes causas (natural o accidental) o incluso que deben ser castrados debido a su fin zootécnico, puede permitir preservar el material genético de dicho animal (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011, Tartaglione *et al.*, 2009, Papa *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004, James *et al.*, 2002) y su transporte a cualquier parte del mundo.

1.2.1.1 Uso de espermatozoides epididimarios

La obtención de espermatozoides del epidídimo ha mostrado ser un recurso accesible para conservar material genético; y el epidídimo de caballos tiene una cantidad significativa de células viables para fertilización (Bruemmer *et al.*, 2002a), además, la obtención de éstos con gestaciones exitosas ha sido reportada en varias especies además del equino y se ha demostrado fertilidad después de la criopreservación (Hernández *et al.*, 2012, Papa *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004, Bruemmer *et al.*, 2002a, James *et al.*, 2002). A pesar de que los procesos de dilución, refrigeración, congelación y descongelación crean daño en el

espermatozoide, se ha observado que los provenientes del epidídimo, muestran mayor resistencia a estos procesos (Monteiro *et al.*, 2013, James *et al.*, 2002), aun cuando han sido refrigerados hasta por 96 horas (Monteiro *et al.*, 2011, Papa *et al.*, 2008, James *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos reproductivos en el macho equino

Durante la reproducción sexual, el espermatozoide y el óvulo se deben fusionar para formar un cigoto diploide. En los equinos como en todos los mamíferos esta fusión depende fuertemente de un conjunto de cambios en la membrana plasmática del espermatozoide y no es de sorprender que estos sean marcadamente diferentes a los de las células somáticas (Gadella *et al.*, 2001).

En general la fertilidad en los equinos es menor y más variable que la de otros animales de granja, principalmente por el tipo de selección que se hace entre los animales que tiene poco o nada que ver con los aspectos reproductivos (Neild *et al.*, 2005), seleccionándolos por su pedigrí, rendimiento deportivo o registros (Salazar *et al.*, 2011).

En los equinos, como en otros animales domésticos, la máxima eficiencia reproductiva se alcanza hasta la pubertad con la mayor producción de espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000); debido a una adecuada frecuencia y cantidad de secreción de hormona gonadotrópica (GnRH) (Senger, 2003d)

Se considera que el garañón en promedio entra a la pubertad a los 20 meses de edad con un rango de 12-24 meses de edad (Senger, 2003d, Hernández y Fernández, 1999). Sus testículos miden de 8-12 cm de largo, 5-7 cm de altura y 4.5-6 cm de ancho. El volumen de eyaculado es de 60-70 ml con un rango de 30-300 ml, de color blanco pálido, con un pH de 7.2 a 7.7. Los espermatozoides muestran una movilidad progresiva de 75%, con un rango de 60-95% y la concentración espermática en el garañón es de 150-300 millones de espermatozoides/ml (Boeta, 2008).

2.2 Fisiología reproductiva

2.2.1 Gametogénesis

La espermatogénesis es una suma de eventos cronológicos de división y diferenciación que tiene como objetivo la producción de espermatozoides (Gil Villa *et al.*, 2007, Amann, 2005b, Senger, 2003a, Johnson *et al.*, 2000, Johnson *et al.*, 1997) tiene lugar en los testículos, específicamente en los túbulos seminíferos (Amann, 2005a, Flesch y Gadella, 2000, Johnson *et al.*, 2000) que están compuestos por células somáticas (células mioideas y de Sertoli) y células germinales (espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas) (Amann, 2005a, Senger, 2003a, Johnson *et al.*, 1997).

Este proceso consiste en la división mitótica de células madre espermatogonias para formar espermatoцитos primarios y por meiosis crear espermátidas haploides y diferenciarse en espermatozoides (Gil Villa *et al.*, 2007, Amann, 2005b, Senger, 2003a, Johnson *et al.*, 2000) y preparar su membrana plasmática y otras estructuras específicas para reaccionar adecuadamente al tracto genital femenino y al óvulo (Flesch y Gadella, 2000).

La espermatogénesis tiene una duración total de 57 días en el caballo (Amann, 2005b, Johnson *et al.*, 1997), la primera etapa de la espermatogénesis es la espermatoцитogénesis y dura 19.4 días, donde la espermatogonia va a tener múltiples divisiones formando cinco tipos de espermatogonias: A1, A2, A3, B1 y B2, con la división de la espermatogonia B2 se forma el espermatoцитo primario (diploide) que entra en la primera división meiótica; todo el proceso meiótico tiene una duración de 19.4 días, la primera división dura 18.7 días y la segunda solo 0.7 días. Por último la espermiogénesis tarda 18.6 días (Morel, 2008) y es la diferenciación de espermátidas con núcleo esférico a espermatozoides (Flesch y Gadella, 2000, Johnson *et al.*, 1997) al final sucede la espermiación que es la liberación de los espermatozoides del epitelio seminífero a la luz tubular (Johnson *et al.*, 2000).

La eficiencia de la espermatogénesis es medida por el número de espermatozoides producido por gramo de parénquima testicular y no está influenciada por la diferencia en el tamaño testicular entre los animales, en equinos en particular es de $16-19 \times 10^6$ cel/g (Johnson *et al.*, 2000).

2.2.2 Morfología espermática

La membrana plasmática espermática cubre a todo el espermatozoide de la cabeza a la cola (Brass, 2001, Flesch y Gadella, 2000, Johnson *et al.*, 1997) y juega un papel importante en la regulación de la interacción espermatozoide-óvulo y, es por ésta razón, que es una estructura extremadamente dinámica (Hernández *et al.*, 2012, Gadella *et al.*, 2001).

El espermatozoide maduro tiene tres regiones especializadas:

- a) La cabeza, que contiene el ADN, y es vital para la interacción espermatozoide-óvulo, y además del núcleo, contiene un pequeño espacio citoplasmático en el extremo apical, llamado acrosoma, que no es más que una vesícula que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para penetrar la zona pelúcida (ZP) (Arenas *et al.*, 2010, Gil Villa *et al.*, 2007, Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000, Johnson *et al.*, 1997), derivada del aparato de Golgi durante la espermiogénesis y por su origen, estructura y función celular, es comparable a un lisosoma (Arenas *et al.*, 2010).

- b) La pieza media que contiene mitocondrias y se encargan de la producción de energía.
- c) El flagelo, es el encargado de la movilidad (Arenas *et al.*, 2010, Gil Villa *et al.*, 2007, Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000, Johnson *et al.*, 1997) (1)

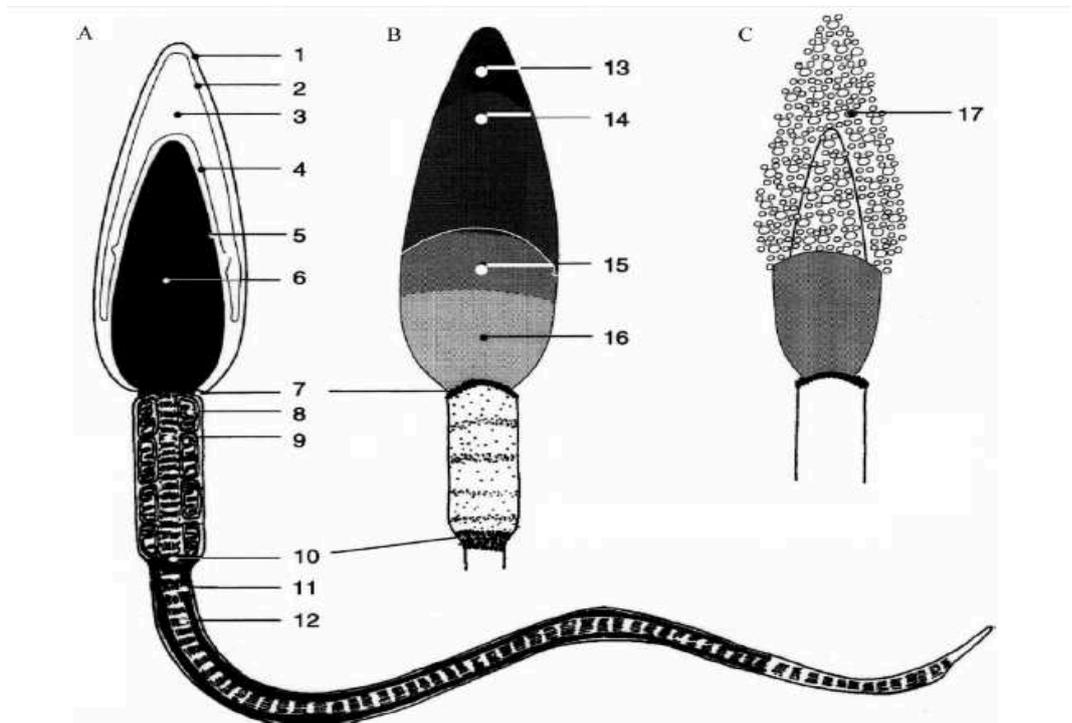


Figura 1. Representación esquemática del espermatozoide equino. (A) vista seccional del espermatozoide. (B) Subdominios de la membrana plasmática de la cabeza espermática (vista superficial). (C) Reacción acrosomal. Líneas sólidas representan bicapa membranal: (1) membrana plasmática; (2) membrana acrosomal externa; (3) espacio acrosomal; (4) membrana acrosomal interna; (5) envoltura nuclear; (6) núcleo; (7) anillo nuclear; (8) mitocondria; (9) parte proximal del flagelo (pieza media); (10) anillo anular; (11) parte distal del flagelo (pieza principal y final); (12) parte fibrosa; (13) subdominio apical; (14) subdominio pre-ecuatorial; (15) subdominio ecuatorial; (16) subdominio post-ecuatorial; (17) vesículas formadas durante la reacción acrosomal con la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Tomada de Gadella *et al.* 2001).

El ADN en el espermatozoide se encuentra como cromatina, formada por ADN y protaminas. Los residuos de cisteína en las protaminas forman enlaces disulfuro que compactan al ADN seis veces mas que en las células somáticas. Estos enlaces protegen el material genético de agentes estresantes como especies reactivas de oxígeno y altas temperaturas durante el transito a través del tracto reproductor masculino y femenino (Nava-Trujillo *et al.*, 2011, Gil *et al.*, 2007).

Cuando los espermatozoides se someten a congelación y descongelación, sin crioprotección, se altera la integridad de las membranas plasmáticas y de otras estructuras (Gil Villa *et al.*, 2007), existe evidencia de que la criopreservación afecta negativamente la integridad del ADN por estrés oxidativo, induciendo fragmentación del ADN (Nava-Trujillo

et al., 2011), pero en ocasiones el núcleo espermático puede mantener las propiedades esenciales para dar comienzo al desarrollo embrionario (Gil Villa *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Composición membranaral

La membrana plasmática del espermatozoide en los mamíferos es una bicapa lipídica altamente específica (Arenas *et al.*, 2010, Gil Villa *et al.*, 2007, Brass, 2001) con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, plasmalógenos y esfingomielinas; estas estructuras son responsables de la flexibilidad y de la capacidad funcional de los espermatozoides (Gil Villa *et al.*, 2007, Brass, 2001) pero constituyen el principal sustrato para la peroxidación, lo cual puede dar lugar a severos desordenes funcionales en el espermatozoide (Gil Villa *et al.*, 2007).

2.2.2.1.1 Proteínas

Las proteínas que se encuentran en la bicapa lipídica están unidas por interacciones no covalentes, y realizan diversas funciones, como son: el transporte de moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; mismas que actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales. (Arenas *et al.*, 2010, Brass, 2001).

2.2.2.1.2 Lípidos

Los lípidos componen entre el 30 y el 50% de la membrana y se encuentran anclados a su posición. Aspecto que resulta importante para la fertilización pues la fusión de los gametos masculino y femenino, requieren la participación particular de un microambiente de lípidos (Arenas *et al.*, 2010). La membrana plasmática de los espermatozoides equinos contiene aproximadamente 57% de fosfolípidos, 37% de colesterol y 6% glicolípidos (Gadella *et al.*, 2001), la diferencia de espermatozoide equino con otras especies es con respecto a su contenido relativamente alto de colesterol el cual parece estar relacionado con la tasa de capacitación, posiblemente porque el colesterol debe ser agotado de la membrana plasmática durante este proceso (Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000). Una de las características de la membrana del espermatozoide que le confiere una mayor reducción de sensibilidad a la temperatura es la proporción de fosfolípidos-colesterol, en equinos es de 0.36 (Oliveira *et al.*, 2010).

Los fosfolípidos a su vez pueden dividirse en fosfoglicerolípidos y esfingomielinas (SM), el espermatozoide del caballo está conformado por 48% de fosfocolinoglicéridos (PC), 16% de fosfoetanolaminoglicéridos (PE), 13% de SM, 15% de fosfatidilserina/cardiolípidina (PS), 5% de fosfatidilglicerol y aproximadamente 3% de fosfatidilinositol (Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000).

Se ha encontrado que los lípidos dentro de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide se organizan en dominios distintos y por medio de marcadores fluorescentes se observa que en espermatozoides recién eyaculados, los lípidos se distribuyen sobre toda la cabeza del espermatozoide, pero una densidad más baja es evidente en el segmento post-ecuatorial. Después de la capacitación, la región post-ecuatorial se vuelve carente de lípidos mientras que la cantidad en la región apical aumenta ligeramente (Gadella *et al.*, 2001).

2.2.2.1.3 Glicocálix

Además de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos, que en la mayoría de los casos son cadenas de azúcares simples o polisacáridos (Arenas *et al.*, 2010).

En el lado extracelular de la membrana plasmática del espermatozoide, hay una serie de carbohidratos que se unen a proteínas (glicoproteínas) o lípidos específicos de la membrana plasmática y se conocen colectivamente como glicocálix. Se ha propuesto que el glicocálix juega un papel importante en la interacción espermatozoide-óvulo porque es la parte del espermatozoide que primero entra en contacto directo con el óvulo. Además, el glicocálix puede ayudar a organizar la membrana plasmática del espermatozoide con la que está en contacto directo a través de proteínas y glicolípidos transmembrana (Gadella *et al.*, 2001).

2.2.3 Morfofisiología del Epidídimo

Los conductos eferentes provenientes del testículo convergen en un único conducto: el epidídimo (Senger, 2003b), una estructura adyacente al testículo cuyas funciones principales son el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides, resultando en la adquisición de movilidad y potencial de fertilidad (Senger, 2003b, Páramo, 2008), además de ser el responsable de la salida de los espermatozoides del sistema reproductor masculino (Senger, 2003b).

Anatómicamente se reconocen tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. Ésta última porción se continua con el conducto deferente, el cual transporta el semen hacia la uretra durante el proceso de eyaculación (Páramo, 2008) gracias a contracciones rítmicas originadas por músculo liso que cubre al epidídimo, transportando a los espermatozoides por todo el conducto, bajo estímulos de oxitocina de origen pituitario, que provoca que estas contracciones sean más intensas durante la eyaculación (Senger, 2003b).

La **cabeza del epidídimo** se subdivide en: cabeza proximal y distal. La cabeza proximal reabsorbe una gran cantidad de líquido testicular, mientras que la cabeza distal secreta fluido hacia la luz del epidídimo, por lo que la concentración espermática en la cabeza del epidídimo aumenta y luego disminuye significativamente. Los espermatozoides

que ingresan a la cabeza del epidídimo poseen gota citoplasmática localizada cerca de la cabeza espermática (gota citoplasmática proximal), son células no móviles y no fértiles (Senger, 2003b).

El **cuerpo del epidídimo**, se encuentra paralelo al conducto deferente y en él la concentración espermática se mantiene relativamente constante, se puede ya encontrar espermatozoides móviles y fértiles, durante el transporte de los espermatozoides por esta estructura la gota citoplasmática se mueve hacia la parte distal de la cola espermática (translocación de gota citoplasmática) y los espermatozoides ya son capaces de unirse al óvulo (Senger, 2003b).

La **cola del epidídimo** consiste en: cola proximal y distal. Los espermatozoides que se encuentran en la cola distal son los que son eyaculados, muestran movilidad normal y potencial de fertilidad, la gota citoplasmática es distal o puede ya no existir (Senger, 2003b).

2.2.3.1 Maduración del espermatozoide

Cuando el espermatozoide llega al epidídimo no está completamente “maduro”, y durante el paso a través de ésta estructura (Papa *et al.*, 2008, Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000), que tiene una duración de 9 días en el equino (cabeza: 1 día, cuerpo: 2, cola: 6 días) (Senger, 2003c), el espermatozoide sufre cambios significativos (Papa *et al.*, 2008, Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000), como la eliminación, modificación y absorción de proteínas y lípidos en la membrana plasmática (Gadella *et al.*, 2001), modificaciones en la cromatina nuclear, migración de gota citoplasmática del cuello a la región del anillo y alteraciones en el tamaño del acrosoma (Papa *et al.*, 2008). La importancia fisiológica de éstos cambios no está completamente estudiado, sin embargo la absorción de algunas proteínas están implicadas en la unión espermatozoide-óvulo (Gadella *et al.*, 2001), adquisición de la movilidad y estabilización de la pieza media y el acrosoma (Papa *et al.*, 2008) y, ciertamente, el espermatozoide está completamente maduro después de que ingresa a la cola del epidídimo (Gadella *et al.*, 2001).

La composición de lípidos de la membrana plasmática es una de las principales características de la maduración espermática, pues el total de lípidos disminuye con el paso a lo largo del conducto epididimario, pues aunque la fosfatidilcolina se encuentra estable en las tres principales regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) las cantidades de fosfatidiletalonamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol declinan significativamente hasta llegar a la región caudal del epidídimo (Arenas *et al.*, 2010).

Los espermatozoides, una vez diferenciados en los testículos, permanecerán en reposo en la luz del túbulo epididimario hasta que sean liberados por la eyaculación junto con el plasma seminal (Monteiro *et al.*, 2011, Senger, 2003c), con una presión osmótica de

300 mOsm/l (Brass, 2001). Diferentes estructuras del tracto genital masculino aportan componentes al plasma seminal: la vesícula seminal contribuye con fructosa, aminoácidos, ácido cítrico, fósforo, potasio y hormonas; la próstata aporta ácido cítrico, fosfatos ácidos, calcio, sodio, zinc, potasio, albúmina y enzimas y, finalmente las secreciones de las glándulas uretrales y bulbo uretrales le proporcionan la textura espesa, color claro y propiedad lubricante al semen (Gil Villa *et al.*, 2007, Senger, 2003c). En condiciones naturales el plasma seminal es esencial para transportar y proteger al espermatozoide de cambios en la presión osmótica, pH y oxidación, además provee energía al espermatozoide, aunque no es necesario para la fertilización (Morel, 2008, Papa *et al.*, 2008, Senger, 2003c).

2.2.4 Procesos de capacitación y reacción acrosomal

Después de que el espermatozoide deja el testículo, cesa la síntesis de lípidos y/o proteínas de la membrana plasmática y el transporte mediado por vesículas se detiene (Gadella *et al.*, 2001, Rathí *et al.*, 2001). Cuando el espermatozoide llega al tracto reproductor femenino es activado nuevamente, un proceso llamado capacitación, donde se inicia una delicada reorientación y modificación de moléculas en la membrana plasmática, con el fin de permitir que el espermatozoide se una a la matriz extracelular del óvulo (zona pelúcida) e inicie una reacción acrosomal, un evento exocitótico que es necesario para que éste penetre la ZP (Arenas *et al.*, 2010, Gadella *et al.*, 2001, Rathí *et al.*, 2001).

2.2.4.1 Capacitación espermática

Después de la eyaculación, el espermatozoide de los mamíferos en general tiene una serie de cambios en la arquitectura de la membrana y en su metabolismo antes de adquirir la habilidad de unirse a la ZP y fertilizar al óvulo, estos cambios son colectivamente llamados capacitación y normalmente ocurren en el tracto genital femenino (Arenas *et al.*, 2010, Neild *et al.*, 2005, Flesch y Gadella, 2000), teniendo una duración de 6 h (Brass, 2001). Estos cambios incluyen la reorganización de las proteínas de membrana, metabolismo de fosfolípidos membranales, reducción de los niveles de colesterol e hiperactivación (Rathí *et al.*, 2001), para dar fluidez a la membrana gracias a la modificación de la arquitectura y composición lipídica (Neild *et al.*, 2005).

El espermatozoide maduro carece de los principales organelos que intervienen en la síntesis y descomposición de lípidos. Además, la superficie de su membrana no está en contacto con las membranas intracelulares porque el transporte mediado por vesículas ha cesado y sólo se reanuda brevemente cuando la membrana plasmática apical se fusiona con la membrana acrosomal externa subyacente durante la reacción acrosómica (Gadella *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000).

Durante la capacitación, la delicada organización de la superficie de los espermatozoides se altera como resultado, al menos en parte, de la eliminación del revestimiento, es decir, del glicocálix, pues la adsorción de los nuevos componentes de los fluidos genitales femeninos y enzimas, modifican sus componentes. Además, se produce una reorganización lateral de proteínas transmembrana a través de la cabeza del espermatozoide (Gadella *et al.*, 2001).

Este proceso se inicia con la entrada a la célula de bicarbonato por canales iónicos o de dióxido de carbono por difusión (Figura 2), esta entrada de bicarbonato activa a la Adenilciclase (AC) con la concomitante producción de AMP cíclico que activa a protein kinasa A (PKA). El papel de la salida de colesterol en la activación de PKA no está claro. Esta salida de colesterol puede inducir el incremento de entrada de bicarbonato o afectar a AC; PKA induce la fosforilación de tirosina (Y) de muchos sustratos (S) más probablemente por la activación de Protein tirosin kinasa (PTK) o la inhibición de protein tirosina fosfatasas (PTP), las proteínas de unión espermatozoide-óvulo y otras proteína membranales fosforilan tirosina por la vía del bicarbonato, induciendo también activación de PKA. La fosfolipasa C citosólica (PLC) es fosforilada en tirosina por la vía bicarbonato-PKA. La fosforilación en tirosina de PLC es subsecuente a la translocación de la membrana plasmática, ésta activación de PKA induce cambios membranales como redistribución lateral de seminolípidos y translocación de aminofosfolípidos, lo más probable es que la salida de colesterol esté involucrada en esta transición de la membrana plasmática y los factores descapacitantes (DF) son removidos de la superficie espermática, dejando al descubierto receptores para progesterona (P₄R) (Flesch y Gadella, 2000).

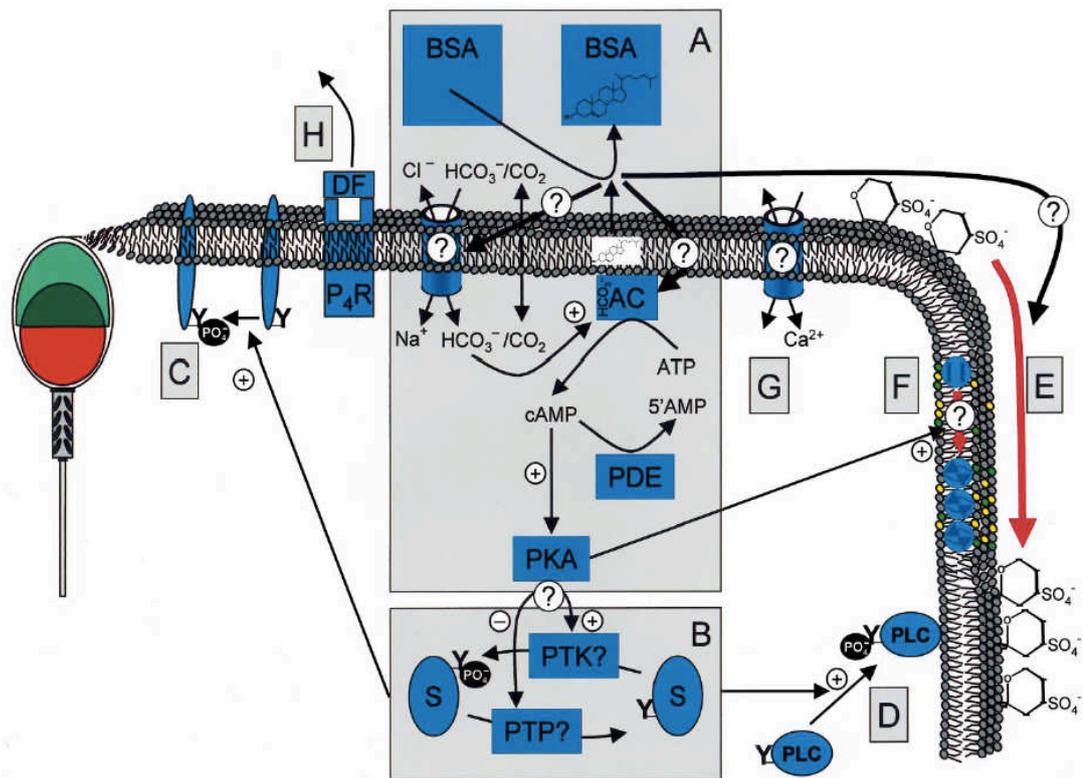


Figura 2. Secuencia del proceso de capacitación espermática. (A) El bicarbonato puede entrar a las célula por canales iónicos o difusión como dióxido de carbono. El bicarbonato intracelular activa Adenilciclase (AC) con la concomitante producción de AMP cíclico que activa a protein kinasa A (PKA). El rol de la salida de colesterol en la activación de PKA no esta claro. Esta salida de colesterol puede inducir el incremento de entrada de bicarbonato o afectar a AC. (B) PKA induce la fosforilación de tirosina (Y) de muchos sustratos (S) mas probablemente por la activación de Protein tirosina kinasa (PTK) o la inhibición de protein tirosina fosfatasa (PTP). (C) Proteinas de unión espermatozoide-óvulo y otras proteína membranales forforilan tirosina por la vía del bicarbonato, induciendo activación de PKA. (D) La fosfolipasa C (PLC) citosólica es fosforilada en tirosina por la vía bicarbonato-PKA. La fosforilación en tirosina de PLC es subsecuente a la translocación de la membrana plasmática. (E) La activación de PKA induce cambios membranales como redistribución lateral de seminolípidos y translocación de aminofosfolípidos. (F) Los aminofosfolípidos son translocados por la activación dependiente de PKA. Lo mas probable es que la salidad de colesterol este involucrada en esta transición de la membrana plasmática. (G) La entrada de pequeñas cantidades de calcio a la célula juega un papel en la capacitación. (H) Los factores descapacitantes (DF) son removidos de la superficie espermática, dejando al descubierto receptores para progesterona (P4R). (Tomada de Flesch & Gadella, 2000).

Las modificaciones lipoproteicas membranales provocan: la exteriorización de receptores, activación de canales iónicos que intervienen en la activación de mecanismos de transducción (flujo de calcio, síntesis de AMP cíclico, fosforilación-desfosforilación de proteínas, etc.) y cambian el metabolismo energético que conduce a la desestabilización de la membrana plasmática a nivel de la región acrosómica y la hiper-activación del movimiento flagelar. Estos cambios permiten al espermatozoide responder a inductores específicos y experimentar la reacción acrosomal al final de la capacitación (Arenas *et al.*, 2010, Flesch y Gadella, 2000).

El glicocálix, rico en carbohidratos cargados eléctricamente unidos a la membrana por uniones superficiales no covalentes (Arenas *et al.*, 2010), cambia notablemente su propiedad de unión específica a carbohidratos (unión lectina) durante la capacitación. Sin embargo, aún no se conoce con certeza si los cambios en unión lectina reflejan una modificación de las estructuras de carbohidratos, expresión o no de éstas estructuras, o

reposicionamiento de glicoproteínas o glicolípidos. Ciertamente, se cree que el reposicionamiento glucolípido durante la capacitación implica la eliminación activa de factores “descapacitantes” y otros factores unidos a la membrana plasmática del espermatozoide y esto es casi seguro que altera el glicocáliz (Gadella *et al.*, 2001).

También se puede observar un intercambio de fosfolípidos que es controlado por una vía de señalización mediada por bicarbonato. En ausencia de bicarbonato, el intercambio puede ser inducido por inhibidores de la fosfodiesterasa (que inhiben la degradación de AMP cíclico) o de la proteína fosfatasa 1 y 2a, activadores de la proteína quinasa A (PKA) y por la adición de análogos de AMP cíclico (Gadella *et al.*, 2001).

En espermatozoides no capacitados, el colesterol se encuentra distribuido en toda la cabeza espermática y en los que ha sucedido la capacitación, el colesterol se limita a la zona ecuatorial y post-ecuatorial de la cabeza, esta depleción de colesterol parece ser un paso inicial y crítico para la activación de la tirosin quinasa, pues la fosforilación de tirosina de proteínas del espermatozoide, es vital para la capacitación porque estos cambios en la conformación de proteínas, contribuyen al incremento de la afinidad con la ZP, hipermovilidad y la inducción de reacción acrosomal (Neild *et al.*, 2005, Flesch y Gadella, 2000, Gadella *et al.*, 2001). También vale la pena señalar que el plasma seminal de los equinos, hombres, y quizá otros mamíferos, contienen vesículas ricas en colesterol que son secretadas por la próstata (prostasomas) que bloquean la salida de colesterol del espermatozoide y probablemente ayudan a retrasar la capacitación hasta el momento apropiado (Gadella *et al.*, 2001).

Una vez que ha ocurrido la capacitación y la unión del espermatozoide a la ZP, es posible y puede desencadenarse la reacción acrosomal, pero también una vez que sucede, la longevidad del espermatozoide disminuye (Neild *et al.*, 2005). Los espermatozoides capacitados tienen una membrana plasmática desestabilizada, que es sensible incluso a pequeñas tensiones ambientales, por lo que disminuir la temperatura de 38 a 30 °C puede inducir reacción acrosomal espontánea (Gadella *et al.*, 2001).

2.2.4.2 Reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es un evento irreversible exocítico que se inicia inmediatamente después del primer contacto del espermatozoide y el óvulo (Arenas *et al.*, 2010, Neild *et al.*, 2005, Gadella *et al.*, 2001, Rathi *et al.*, 2001, Flesch y Gadella, 2000). La membrana plasmática del espermatozoide se une con la membrana acrosomal, subyacente en varios sitios, y el contenido del acrosoma se libera, pues se requiere la liberación de enzimas hidrolíticas para disolver la matriz de la ZP y sea posible la entrada del espermatozoide al espacio perivitelino (Arenas *et al.*, 2010, Neild *et al.*, 2005, Gadella *et al.*, 2001, Flesch y

Gadella, 2000) adicionalmente se inicia una hipermovilidad que va a facilitar su desplazamiento y la penetración de las cubiertas del óvulo y finalmente la unión con éste (Arenas *et al.*, 2010, Flesch y Gadella, 2000). Una importante consecuencia de la RA es la adquisición de fusogenicidad en el segmento ecuatorial de la membrana plasmática, que es requerido para la unión y fusión con el oolemma (Neild *et al.*, 2005). Sin embargo, si la RA se inicia muy temprano (es decir, antes de la unión a la ZP) se perderán las enzimas y el espermatozoide ya no será capaz de penetrar en dicha zona y, por tanto, la fertilización tampoco será posible (Gadella *et al.*, 2001).

Para que la fusión de membranas se realice, se requieren concentraciones citosólicas de Ca^{2+} bastante altas (Arenas *et al.*, 2010, Neild *et al.*, 2005, Gadella *et al.*, 2001). Por lo que el Ca^{2+} extracelular tiene que pasar a través de la membrana plasmática antes de la iniciación de la reacción acrosómica por lo que canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son activados gracias a la unión a la ZP (Figura 3) (Gadella *et al.*, 2001).

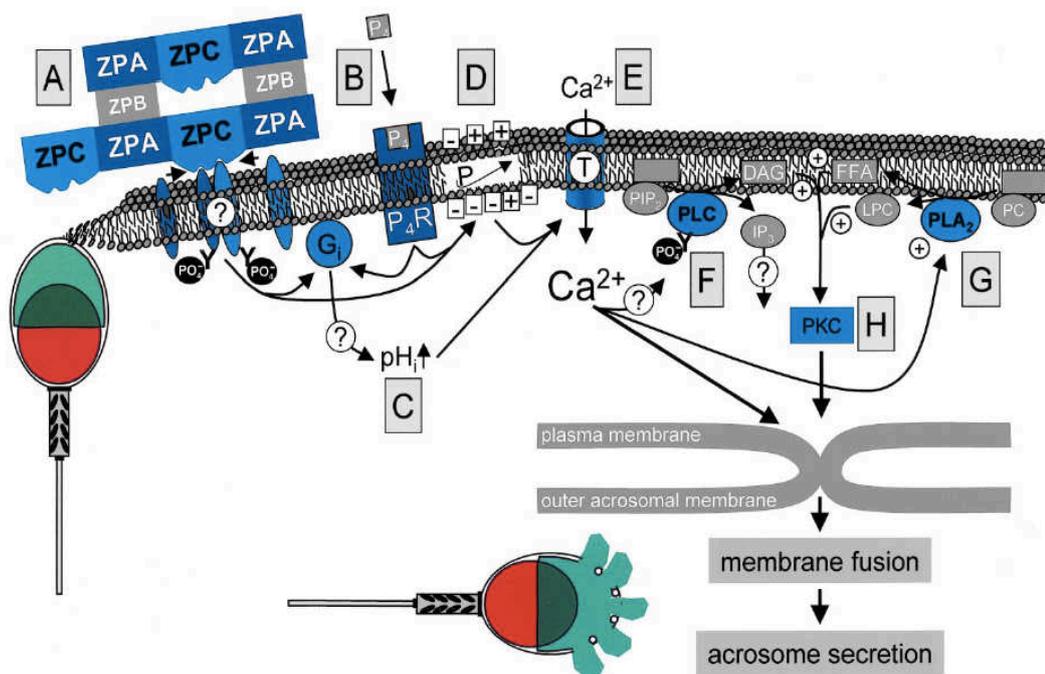


Figura 3. Secuencia de la reacción acrosomal inducida por zona pelúcida (ZP) y progesterona. (A) Proteínas de la ZP (mas comúnmente ZPC) se unen a los receptores espermáticos para ZP, lo que lleva a la agregación y fosforilación de tirosina (Y). (B) El entorno directo de la ZP contiene altos niveles de progesterona que pueden unirse a su receptor no genómico (P4R) en la superficie espermática. La ZP y la progesterona tienen un efecto doble sobre el espermatozoide. (C) El pH intracelular (pHi) se incrementa por la vía de proteína G (Gi) y (D) el potencial de la membrana plasmática se despolariza. (E) Tanto el incremento en el pH como la despolarización inducen la entrada de calcio por un canal de Ca^{2+} de tipo voltaje-dependiente. (F) Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular activan a la fosfolipasa C (PLC) que ha sido translocada de la membrana plasmática durante la capacitación. la PLC convierte el fosfatidilinositol-4,5- bifosfato (PIP2) a diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). (G) El aumento en los niveles de Ca^{2+} activa a la fosfolipasa A2 (PLA2), que degrada fosfolipasa glicérido (PC) a lisofosfatidilcolina (LPC) y ácidos grasos libres (FFA). (H) DAG, FFA y LPC activan a la proteína quinasa C (PKC). Tanto el incremento intracelular de Ca^{2+} como la activación de PKC son necesarias para la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal, con la subsecuente secreción de enzimas acrosomales (Tomada de Flesch & Gadella, 2000).

La progesterona, como otras hormonas esteroides, ejerce sus efectos biológicos sobre expresión de proteínas a través de receptores intracelulares. Sin embargo, en varios tipos de células de mamíferos, como en el espermatozoide, los receptores de hormonas esteroides también se encuentran en la membrana plasmática (Arenas *et al.*, 2010, Gadella *et al.*, 2001) y la afinidad a éstos sitios de unión de progesterona es baja en comparación con los receptores citosólicos de células somáticas. Sin embargo, la estimulación de reacción acrosomal por la progesterona es fisiológicamente relevante debido a que el líquido folicular que rodea a un óvulo ovulado contiene enormes cantidades de ésta hormona (Gadella *et al.*, 2001).

Mecánicamente, la progesterona induce un aumento en el Ca^{2+} intracelular de espermatozoides capacitados (Gadella *et al.*, 2001, Arenas *et al.*, 2010) a través de canales de Cl^- y el receptor ácido γ -aminobutírico_A (GABA_A). También parece que la progesterona prepara a la membrana plasmática del espermatozoide para tener una reacción acrosomal más fácilmente en respuesta a la unión a la ZP. Por último, la exposición del receptor de progesterona se regula por la secreción de glándulas sexuales accesorias pues se ha visto que espermatozoides recién eyaculados de varios mamíferos (incluyendo caballos) no se unen a la progesterona pero, durante la capacitación *in vitro*, recuperan su afinidad por la progesterona y muestran reacción acrosomal en respuesta a la exposición a ésta hormona. Estos resultados sugieren que algunos factores que se encuentran en el plasma seminal se eliminan durante la capacitación, lo que lleva a la exposición de receptores de progesterona permitiendo a las células responder a la hormona (Gadella *et al.*, 2001).

La entrada de Ca^{2+} provoca la desactivación de las ATPasas, además de un aumento del Na^+ intracelular con una salida de H^+ y en consecuencia, un aumento del pH intra-acrosomal, lo que induce la activación de enzimas como la acrosina (Gadella *et al.*, 2001). Además, se ha observado como el aumento de Ca^{2+} intracelular, también conduce a una serie de modificaciones en los lípidos como la formación de segundos mensajeros, que se incorporan a una cascada de acontecimientos que ocurren durante la reacción acrosómica y la activación de determinadas enzimas como una fosfolipasa A₂, específica de la fosfatidilcolina, que genera lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico, sustancias conocidas por sus propiedades de fusión necesarias en la reacción acrosomal (Arenas *et al.*, 2010).

2.3 Criopreservación de espermatozoides equinos

La criopreservación de semen equino ha ganado popularidad, ya que prolonga el tiempo de almacenamiento de los gametos y ofrece beneficios adicionales, incluyendo una

forma más fácil para entregar y conservar material genético (Monteiro *et al.*, 2013, Olaciregui *et al.*, 2014, Salazar *et al.*, 2011, Goolsby *et al.*, 2004, Hoffmann *et al.*, 2011, Macias *et al.*, 2012), contribuyendo a la expansión de las diversas técnicas de reproducción como la inseminación artificial (IA), fertilización *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática (ICSI). Se ha visto que la IA con semen congelado es un elemento esencial en los programas de mejoramiento y selección, aumentando la producción de especies domésticas (Hernández *et al.*, 2012, Salazar *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015, Pojprasath *et al.*, 2011, Macias *et al.*, 2012).

Sin embargo, se considera que el éxito de la criopreservación de espermatozoides de equino, generalmente es menor que el de espermatozoides de toro (Salazar *et al.*, 2011, Squires *et al.*, 2004), o cuando se usa semen fresco para inseminar o monta natural (Goolsby *et al.*, 2004, Pojprasath *et al.*, 2011). Como ya se ha mencionado, la membrana plasmática del espermatozoide es de vital importancia en el proceso de fertilización (capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide con el óvulo) (Olaciregui *et al.*, 2014) y se ha estimado que solo el 20-40% de los equinos producen semen con características favorables para la criopreservación (Olaciregui *et al.*, 2014, Salazar *et al.*, 2011, Pukazhenthil *et al.*, 2014, Pojprasath *et al.*, 2011, Hoffmann *et al.*, 2011, Alvarenga *et al.*, 2005), pues durante este proceso, se producen alteraciones en el espermatozoide (Pojprasath *et al.*, 2011, Hernández *et al.*, 2012, Pillet *et al.*, 2012) causando una disminución en los espermatozoides viables y no más del 50% sobrevive a la criopreservación y las células que siguen vivas pueden tener procesos como capacitación y reacción acrosomal inducidas por el proceso de criopreservación, lo cual evita que penetre el óvulo y por lo tanto pierde su capacidad fecundante (Hernández *et al.*, 2012, Pojprasath *et al.*, 2011). En general se ha observado que en espermatozoides de equino criopreservados la movilidad, viabilidad e integridad membranal, es menor, en comparación con los espermatozoides de eyaculado en fresco (Wrench *et al.*, 2010).

Los principales factores que se han visto están involucrados en los pobres porcentajes de fertilidad de espermatozoides equinos, son: la técnica de congelamiento, la composición del diluyente, el tipo de crioprotector utilizado (Pojprasath *et al.*, 2011, Perez-Osorio *et al.*, 2008), la resistencia de la célula al estrés osmótico y la posible interacción entre factores (Perez-Osorio *et al.*, 2008), así como el proceso de descongelación (Alberio *et al.*, 2003, Salazar *et al.*, 2011). Se han generado dos hipótesis: la primera dice que al congelar las células muy rápido provoca su muerte por la formación intracelular de hielo, mientras que al hacerlo muy lento mueren por la larga exposición a soluciones concentradas, resultando en una fase de conversión progresiva de agua líquida a hielo (Macias *et al.*, 2012).

2.3.1 Técnicas de obtención de espermatozoides utilizadas en equinos

Los espermatozoides equinos pueden ser recolectados por varias técnicas como la vagina artificial, electroeyaculación, condón en el pene, recuperación de la vagina de una yegua después del apareamiento natural, y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo, sin embargo, no todas son de uso común ni de utilidad práctica (Papa *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Vagina artificial

Es la técnica de recolección de semen más comúnmente usada en reproducción equina (Monteiro *et al.*, 2013, Pukazhenthithi *et al.*, 2014) y con el uso de ésta técnica, se trata de simular las condiciones de temperatura (42-44 °C), presión y lubricación de la vagina de la yegua, estímulos necesarios para desencadenar la eyaculación (Brass, 2001).

El número promedio de espermatozoides obtenidos por vagina artificial es de $7.8 \pm 4.69 \times 10^9$ (Monteiro *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Electroeyaculación

La electroeyaculación es un método ampliamente utilizado para la recolección de semen en algunas especies como bovinos y ovinos, pero su uso en los equinos no es recomendable debido a los riesgos tanto para los animales como para el operador (Papa *et al.*, 2008). Además, involucra el uso de anestesia general en los caballos y la colocación de un electroestimulador vía rectal con un voltaje de 2-6 V (Pukazhenthithi *et al.*, 2014).

En raras ocasiones se utiliza la electroeyaculación y no es considerada una técnica eficaz para obtener espermatozoides viables, pues hay menor calidad espermática, en su mayoría caracterizada por menor movilidad, probablemente relacionada por la contaminación de orina (Papa *et al.*, 2008, Pukazhenthithi *et al.*, 2014).

2.3.1.3 Recuperación post-mortem

La capacidad de la obtención y preservación de espermatozoides de epidídimo de caballo después de la castración, ya sea por elección, lesión traumática, enfermedad grave o muerte inesperada, ha permitido la conservación del material genético, gracias a los avances continuos en las técnicas de asistencia reproductiva (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2013, Monteiro *et al.*, 2011, Olaciregui *et al.*, 2014, Gonzales *et al.*, 2015, Bruemmer *et al.*, 2002a, Papa *et al.*, 2008, James *et al.*, 2002). La cola del epidídimo de equinos contiene una cantidad significativa de espermatozoides con capacidades fertilizantes (Bruemmer *et al.*, 2002a) y el número total de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo es de

$25.0 \pm 17.1 \times 10^9$ (Monteiro *et al.*, 2011), mayor del que se puede obtener con vagina artificial en una sola recolecta (Olaciregui *et al.*, 2014, Papa *et al.*, 2008).

Varios métodos de recuperación de espermatozoides de cola del epidídimo se han descrito incluyendo aspiración, flotación (donde segmentos de epidídimo se colocan en un medio de gel durante un período de tiempo) y lavado retrógrado de la cola en el que la presión es generada por una jeringa conectada al conducto deferente y los espermatozoides son transportados por el extensor y expulsados a través de un corte en la cola y cuerpo del epidídimo del caballo (Papa *et al.*, 2008).

La técnica de lavado retrógrado del epidídimo es considerado un procedimiento rápido y eficiente para la recuperación de espermatozoides epididimarios en la especie equina. Con este procedimiento, se ha informado una recuperación de espermatozoides similar o mayor a la obtenida en eyaculados con vagina artificial (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015, Papa *et al.*, 2008) y mayor que con la técnica de flotación (Papa *et al.*, 2008), así mismo, se ha demostrado que, estos espermatozoides son fértiles (Gonzales *et al.*, 2015).

2.3.2 Proceso de criopreservación

Antes del proceso de congelamiento debe haber una curva de enfriamiento lenta de 37 °C a 5 °C en un periodo de 50 minutos (Oliveira *et al.*, 2010) a 2.5 horas (Clulow *et al.*, 2008); el enfriamiento de los espermatozoides disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides, reduce el crecimiento bacteriano y, de esa manera, prolonga la viabilidad de los espermatozoides (Brass, 2001) un enfriamiento a velocidad lenta puede aumentar la resistencia a las lesiones por frío en la membrana acrosomal y la membrana plasmática en el espermatozoide (Olaciregui *et al.*, 2014, Brass, 2001). Se ha observado que la calidad del espermatozoide sometido a una velocidad de enfriamiento lenta, antes de la congelación, es mayor que cuando es utilizada una velocidad de enfriamiento rápida (Olaciregui *et al.*, 2014, Salazar *et al.*, 2011), pues si los espermatozoides de equino se enfrían rápidamente, la membrana espermática tiene cambios irreversibles por choque térmico (Olaciregui *et al.*, 2014, Brass, 2001). Estas alteraciones están representadas por la pérdida rápida de movilidad, la alteración del tipo de movilidad con movimiento retrógrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática, acompañada de pérdida de los componentes intracelulares (Brass, 2001).

Con el enfriamiento, los lípidos sufren una transición a la fase líquida cristalina y posteriormente a una de gel, una vez que se encuentran en estado de gel, los lípidos tienden a agregarse, formando microdominios en áreas aún fluidas. Estos lípidos agregados, no se integran comúnmente con las proteínas asociadas con otros lípidos, por lo que los bordes de

estos microdominios se convierten en áreas más frágiles sujetas a la fusión o ruptura, además de volverse más permeables a los iones. Desde los 5° C la permeabilidad al Ca^{2+} crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca^{2+} , así, éste ion se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Brass, 2001).

El efecto de la criopreservación depende también de su curva de congelación. Si los espermatozoides son congelados a una velocidad moderada (-25 a -40 °C/min), el agua no congelada en el interior de la célula se difunde al medio extracelular, debido a la mayor concentración de solutos en la fracción no congelada de éste. Si en cambio la velocidad de congelación es lenta (<-25 °C/min, los espermatozoides se deshidratan y no se forman cristales de hielo, sin embargo, esto resulta en elevadas concentraciones intracelulares de solutos que pueden dañar a los espermatozoides. Por otro lado, si la congelación es rápida (> -60 °C/min) el agua intracelular no dispone de tiempo suficiente para difundir fuera del espermatozoide antes de congelarse, formando cristales intracelulares de hielo, resultando en lesión celular (Brass, 2001).

La adición de colesterol en el extensor de criopreservación ha mostrado ser una alternativa para incrementar la estabilidad de la membrana durante éste proceso de congelación, aunque se le ha atribuido una menor tasa de fertilidad en yeguas, debido a que el colesterol puede inhibir la reacción acrosomal (Oliveira *et al.*, 2010)

El proceso de congelamiento puede ser con un congelador programable disminuyendo la temperatura a -50 °C/min en 1 min, luego -10 °C/min por 6 min hasta llegar a -110 °C donde se aumenta la velocidad de congelamiento a -50 °C/min hasta obtener -150 °C (Clulow *et al.*, 2008). También pueden ser utilizados vapores de nitrógeno, colocando nitrógeno líquido en una caja de poliestireno expandido y un rack con las pajillas a 3 cm de distancia del nitrógeno por un periodo de 7 (Clulow *et al.*, 2008) a 20 minutos (Oliveira *et al.*, 2010), donde alcanzan una temperatura de -15 a -60 °C y los espermatozoides se tornan relativamente inertes (Brass, 2001) y son transferidos al nitrógeno líquido a -196 °C para su almacenamiento (Clulow *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2010, Brass, 2001). En este momento las células son menos susceptibles a lesiones inducidas por las altas concentraciones de sales y pueden ser conservados por tiempo indeterminado a esta temperatura (Brass, 2001).

Se ha reportado que la movilidad espermática progresiva es mayor cuando se congela con congelador programable que con caja de poliestireno, inmediatamente después de descongelar y a las 3 horas ($p < 0.05$). Sin embargo, las ventajas de usar una caja de congelación es que es un método barato, fácil de usar, requiere de poca cantidad de nitrógeno líquido y es portable, mientras que un congelador programable es caro, usa una gran cantidad de nitrógeno líquido y solo puede ser usado en laboratorio, y a pesar de que

hay diferencias en los valores de movilidad no se han reportado diferencias en otros parámetros de calidad en el espermatozoide (Clulow *et al.*, 2008).

A la temperatura del nitrógeno líquido, dentro de las pajillas de congelación hay canales de agua no congelada con concentraciones más altas de solutos. El volumen de esta fracción no congelada es muy importante porque solamente espermatozoides presentes en estos espacios sobreviven a la criopreservación. Por lo tanto la criopreservación de espermatozoides en concentraciones demasiado altas, disminuye el porcentaje de células que sobreviven a la congelación (Brass, 2001).

La descongelación de las pajillas se realiza colocándolas en agua a 37 °C por 30 segundos (Clulow *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2010, Squires *et al.*, 2004, Gonzales *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Daños durante la criopreservación de espermatozoides

Las lesiones causadas por criopreservación en las células son probablemente debidas a los efectos acumulativos de muchos diferentes modos de crio-lesión, como: formación de hielo intracelular, "Efectos de soluto" generalizada, pérdida de componentes de la membrana, deshidratación de la membrana, desnaturalización de proteínas (tanto membranales y citoplásmicas), burbujas de gas, daños lisosomales y punción de la membrana (Kruuv *et al.*, 1990). Un buen crioprotector debe proteger a la célula contra todos estos tipos de crio-lesiones (Kruuv *et al.*, 1990, Perez-Osorio *et al.*, 2008), pues los espermatozoides equinos no pueden sobrevivir la congelación sin crioprotección (Squires *et al.*, 2004), aunque la presencia de éste, puede potencialmente inducir daño por la expansión y contracción de volumen (Perez-Osorio *et al.*, 2008).

El estrés osmótico durante la criopreservación es el resultado de la adición o remoción de crioprotectores y por el mismo procedimiento de enfriamiento (Perez-Osorio *et al.*, 2008, Hoffmann *et al.*, 2011, Macias *et al.*, 2012). La respuesta osmótica de la célula depende de su permeabilidad membranal al agua, así como, de su permeabilidad membranal a los agentes crioprotectores. Esta relativa permeabilidad cambia con la temperatura y el espermatozoide solo es capaz de tolerar un rango de cambios en la presión osmótica. Se ha visto que el espermatozoide equino es capaz de regular su medio ambiente interno a condiciones isosmóticas después de ser expuesto a osmolalidades de 75–900 mOsm kg⁻¹. Sin embargo desde que es expuesto a osmolalidades cerca de 450 mOsm kg⁻¹, empiezan a crearse severas alteraciones en su función (Hoffmann *et al.*, 2011).

2.4 Eficiencia de espermatozoides epididimarios

Se ha demostrado que espermatozoides recuperados de epidídimo son altamente eficientes, e incluso cuando se mantienen a temperatura ambiente siguen siendo viables hasta 24 horas después de realizada la orquidectomía, y pueden ser utilizados posteriormente en inseminación artificial (IA) (Hernández *et al.*, 2012, Gonzales *et al.*, 2015, Papa *et al.*, 2008); los porcentajes de movilidad progresiva después de 24 y 48 horas de refrigeración (4-5 °C) comparados con los obtenidos de eyaculado en los mismos tiempos son mayores (Monteiro *et al.*, 2013, Bruemmer *et al.*, 2002a) e incluso se ha visto que cuando los testículos son almacenados de 4-5 °C por 24 horas, los espermatozoides obtenidos de estos tienen un porcentaje de viabilidad superior (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015) y almacenados hasta por 96 h en refrigeración mantienen porcentajes de movilidad e integridad membranal adecuados (James *et al.*, 2002).

La teoría más aceptada de la etiología de estas diferencias es que el fluido seminal de los equinos tiene una alta concentración de Cl⁻ y Na⁺, y estas sustancias son perjudiciales para la supervivencia de los espermatozoides durante el proceso de enfriamiento y almacenamiento, además, ciertas proteínas del plasma seminal pueden promover cambios bioquímicos, causando daño a la membrana plasmática, lo que lleva a la disminución de la fertilidad de espermatozoides eyaculados y congelados (Monteiro *et al.*, 2013, Brass, 2001)

Adicionalmente, aunque los porcentajes son bajos, debido a la baja movilidad de espermatozoides epididimarios (Papa *et al.*, 2008), se han reportado gestaciones exitosas en diferentes especies animales, incluido el hombre y el equino (Hernández *et al.*, 2012, Bruemmer *et al.*, 2002a, James *et al.*, 2002),

Actualmente se ha investigado con mayor auge la conservación de gametos obtenidos del epidídimo debido a que hay evidencia de sustancias a nivel epidídimo que causan modificaciones en la membrana del espermatozoide (Hernández *et al.*, 2012). Una de estas sustancias es la inmovilina, una glicoproteína con alto peso molecular que aumenta la viscosidad del fluido epididimario y por lo tanto reduce la movilidad del espermatozoide (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011). También se plantea una inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa y cambios en los niveles de AMP cíclico, que en conjunto ayudan a proporcionar una mayor resistencia al choque frío, en comparación con el espermatozoide obtenido de eyaculado, demostrando así más resistencia a los procedimientos de refrigeración y congelación (Hernández *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Hipótesis

El tiempo de almacenamiento *post-mortem* modifica la presencia y distribución de carbohidratos membranales y Ca^{2+} en espermatozoides epididimarios en fresco y criopreservados.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

Describir el efecto del almacenamiento *post-mortem* en espermatozoides epididimarios en fresco y criopreservados en la presencia y distribución de carbohidratos membranales y Ca^{2+} .

3.2.2 Específicos

1. Determinar los parámetros espermáticos básicos en las diferentes condiciones de almacenamiento.
2. Evaluación de la presencia y distribución de carbohidratos membranales en las diferentes condiciones de almacenamiento.
3. Evaluación de la presencia y distribución de Ca^{2+} en las diferentes condiciones de almacenamiento.

3.3 Materiales y método

3.3.1 Material biológico

3.3.1.1 Animales

Se obtuvo testículos de 33 caballos machos adultos criollos destinados a sacrificio, el tamaño de muestra fue calculado a partir de un estudio piloto (n=13) donde el grupo control lo conformaron 6 muestras, con una \bar{x} =31.666 y S^2 =18.348 para movilidad progresiva y se utilizó la fórmula: $n = \frac{2(Z\alpha+Z\beta)^2 S^2}{d^2}$

Dónde:

$Z\alpha$: valor de Cuadros bilateral (1.96)

$Z\beta$: valor de Cuadros de potencia de prueba (0.842)

S^2 : varianza del grupo control

d: precisión

Con un nivel de confianza del 95%, una potencia de prueba de 0.80 y una precisión de 3%.

Se seleccionaran aquellos caballos con edades de entre 3 a 15 años, calculada por observación de piezas dentarias permanentes y el desgaste de éstas (FAO, 1995).

3.3.1.2 Ubicación

La obtención de material biológico se realizó en un rastro en Río Frío, Estado de México, en el municipio de Ixtapaluca (19°21'09"N 98°40'11"O), a una altitud de 3,000 metros sobre el nivel del mar. Donde el clima es templado subhúmedo, con lluvias en verano, temperatura media del mes más frío inferior a 18°C, pero superior a -3 °C; la precipitación del mes más seco es menor a 40 mm.

El rastro recibe caballos, mulas y asnos, de lunes a viernes, provenientes de Veracruz, Tabasco y Puebla, en diferentes tipos de transportes con una densidad promedio de 0.88 m²/caballo y una duración promedio de transporte de 12.6 horas. El espacio que tiene la función de corral de estancia tiene un área de 490.12 m² que puede albergar hasta 280 caballos. No se les ofrece agua ni alimento en ningún momento de su estancia en rastro.

Los animales son aturdidos por medio de un golpe contuso en la zona frontal del cráneo con un martillo de 2 kg de peso sin una distancia específica de fuerza, después de que los caballos caen por el golpe de aturdimiento, son desangrados por degüelle en un periodo que no dura más de 5 minutos.

3.3.1.3 Obtención y transporte del material biológico

La obtención de material biológico se realizó, inmediatamente después de ser sacrificados los animales (Martinez-Pastor *et al.*, 2006), realizando disección de la bolsa escrotal y orquidectomía a nivel del plexo pampiniforme; ambos testículos fueron colocados en bolsas de polietileno, con 20 ml de solución salina al 0.9% estéril. La fecha y hora de muerte, colección y refrigeración fueron anotados en cada bolsa. Las muestras se transportaron al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción en la UAM-Xochimilco en una caja de poliestireno, con refrigerantes manteniendo una temperatura de 4-5 °C (Hernández *et al.*, 2012), monitoreada con un termómetro digital infrarrojo (Microlife® NC 100).

3.3.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios

Una vez en laboratorio las muestras fueron seleccionadas por muestreo aleatorio simple sin reemplazo para ser asignadas a alguno de los grupos de refrigeración 2, 24, 48, 72 y 96 horas, donde de acuerdo al grupo asignado fueron las horas que los testículos permanecieron en un refrigerador a 4 °C.

Una vez cumplido el tiempo de refrigeración de cada grupo, los testículos fueron diseccionados aislando el conducto deferente y la cola del epidídimo para la obtención de espermatozoides por técnica de cortes y flotación (Martinez-Pastor *et al.*, 2006), colocando lo obtenido de los dos testículos en un tubo cónico de 15 ml con 5 ml de medio base EDTA Glucosa (Cuadro 2) (Olaciregui *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Composición del medio base EDTA glucosa

Compuesto	mM
C ₆ H ₁₂ O ₆	322.20
EDTA disódico	9.93
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	12.58
NaHCO ₃	14.28
pH	6.5

(Olaciregui *et al.*, 2014, Clulow *et al.*, 2008)

3.3.3 Evaluación espermática básica

Las evaluaciones espermáticas se realizaron en dos momentos del diseño, 1) al cumplir su tiempo de refrigeración asignado y posterior a la obtención de espermatozoides, y 2) al ser descongelados los espermatozoides, después del proceso de criopreservación; en

ambos casos las muestras fueron evaluadas después de una incubación de 10 minutos a 37 °C.

3.3.3.1 Movilidad total y progresiva

Una alícuota en un portaobjetos de 10 µl de muestra se observó bajo un microscopio óptico y un objetivo de 20X, para evaluar la movilidad total y progresiva, expresada en porcentajes (Clulow *et al.*, 2008). Se utilizó un sistema de observación subjetivo, estimando la proporción total de espermatozoides con movilidad total (curvilínea, lenta y sin desplazarse) y la movilidad progresiva equivalente a un movimiento rectilíneo y rápido (Clulow *et al.*, 2008, Toro, 2009).

3.3.3.2 Viabilidad

Se determinó utilizando solución eosina-nigrosina (Hernández *et al.*, 2012, Jiménez *et al.*, 2003, Hewitt *et al.*, 2001, Olaciregui *et al.*, 2014, Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), en una dilución 1:1 (v/v) con la solución de tinción (5% eosina y 10% nigrosina en medio EDTA glucosa) y se realizó un frotis en un portaobjetos (Olaciregui *et al.*, 2014). Evaluando 100 células en un microscopio óptico en objetivo 40X (Hernández *et al.*, 2012, Jiménez *et al.*, 2003) donde las células no teñidas fueron clasificadas como vivas (Olaciregui *et al.*, 2014). El resultado se expresó en porcentaje.

3.3.3.3 Morfología

Se analizó bajo un microscopio óptico, con aceite de inmersión a 100X (Cary *et al.*, 2004, Clulow *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2012) usando tinción de eosina-nigrosina (Cary *et al.*, 2004, Clulow *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2012, Hewitt *et al.*, 2001, Jiménez *et al.*, 2003, Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008). Analizando 100 células espermáticas y las anormalidades tanto de tipo primarias como secundarias, los resultados fueron expresados en porcentajes.

3.3.3.4 Concentración espermática

La concentración de espermatozoides se hizo con un hemocitómetro de Neubauer; donde una pipeta de Thomas para glóbulos blancos fue llenada hasta la marca de 0.5 con la muestra espermática y después con solución salina al 0.9% hasta la marca de 1.1 (Lucio *et al.*, 2009, Lucio *et al.*, 2013). Después de una agitación vigorosa, se llenaron ambos lados de la cámara de Neubauer con 10 µl de la solución para hacer el recuento bajo un objetivo del microscopio óptico de 20-40X (Cary *et al.*, 2004, Clulow *et al.*, 2008, Hewitt *et al.*, 2001). Contando en el cuadrante central los espermatozoides cuyas cabezas estén dentro de la

cuadrícula central en cinco cuadrados (Toro, 2009) de ambas cámaras para obtener el promedio de ambas (Cano y Felipe, 2013).

Ya que se tuvo el total de células se aplicó la siguiente fórmula:

$$Ezp = \frac{E \times 250,000}{CD}$$

Dónde:

E= número de espermatozoides contados

C= número de cuadros contados

D= factor de dilución (1/10)

Obteniendo el recuento de espermatozoides por ml.

3.3.4 Evaluación de la actividad de calcio

Para evaluar la actividad de calcio en espermatozoides, se utilizó Clortetraciclina (CTC), dicha solución (750 mM CTC en 322.20 mM $C_6H_{12}O_6$, 9.93 mM $C_{10}H_{16}N_2O_8$, 12.58 mM $Na_3C_6H_5O_7$ y 14.28 mM $NaHCO_3$) fue preparada y el pH ajustado a 6.5 con NaOH (1N), se incubó a 37°C y protegió de la luz (Chamberland *et al.*, 2001, Merino *et al.*, 2004, Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008). Para el ensayo se colocaron 5 μ l de la solución de CTC y 5 μ l de la muestra en un portaobjetos atemperado y se realizó un frotis, protegiéndolo siempre de la luz, para ser evaluado inmediatamente.

Por cada muestra se evaluaron 100 espermatozoides utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 (AccesoLab, México), con un filtro V-2A (400-450 nm de excitación y 470 nm de emisión) con objetivo 100X, utilizando una cámara digital EvolutionVF Color Cooled y el programa Image-Pro® Plus (Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD) para la captura de imágenes.

Fueron clasificaron de acuerdo a la zona de fluorescencia en: T, con fluorescencia uniforme en toda la cabeza, lo que indicó espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto; A, libre de fluorescencia en la región post acrosomal que indicó espermatozoides capacitados con el acrosoma intacto; PA, con fluorescencia en la región postacrosomal o región ecuatorial, que indica reacción acrosomal; y SF: cabeza libre de fluorescencia, lo que significó espermatozoide capacitado con reacción acrosomal (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008)

3.3.5 Evaluación de la distribución de ácido siálico, N-acetilglucosamina y residuos de manosa y galactosa en la membrana espermática

Se utilizaron dos lectinas conjugadas a isotiocinato de fluoresceína (FITC): *Triticum vulgaris agglutinin* (WGA), específica de ácido siálico y N-acetilglucosamina (Jiménez *et al.*, 2003, Sinowatz y Friess, 1983) y *Pisum Sativum agglutinin* (PSA), específica para residuos de manosa y galactosa (Ghitescu y Robert, 2002), del laboratorio Sigma (St Louis, Mo). Ambas lectinas fueron diluidas en medio TRIS (239.39 mM TRIS 1 M, 70.26 mM $C_6H_8O_7$, 69.38 mM $C_6H_{12}O_6$); WGA a una concentración $<50\mu\text{g/ml}$ y PSA a $<20\mu\text{g/ml}$ a un pH de 6.8, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Se realizó la técnica propuesta por Jiménez *et al.* (2003) modificada donde se incubarán por 20 minutos en incubadora de CO_2 a 37°C : 5 μl de muestra, 15 μl de medio base y 5 μl de lectinas. Se centrifugaron por 1 min (Numak®, 2098, Argentina) a una fuerza de centrifugación de $5000 \times g$, para eliminar el sobrenadante y fijar con 30 μl de metanol.

Una alícuota de los espermatozoides marcados con lectina fueron observados con un microscopio con sistema de epifluorescencia bajo un objetivo de 100X e iluminación excitación de 494 nm y emisión a 520 nm, se contaron 100 células para observar la región fluorescente, y los patrones presentes; se determinó la proporción en porcentaje de espermatozoides identificados con cada patrón.

3.3.6 Proceso de criopreservación

La muestra fue diluida para ajustar una concentración espermática de 100×10^6 Ezp/ml (Hernández *et al.*, 2012, Martínez-Pastor *et al.*, 2006, Monteiro *et al.*, 2011) y se adicionó 20% (v/v) de yema de huevo y como crioprotector penetrante 5% (v/v) de Dimetilformamida (DMF) (Olaciregui *et al.*, 2014), después de un periodo de equilibrio de 30 minutos se llenaron pajillas de 0.5 ml previamente enfriadas (5°C), para ser congeladas en vapores de nitrógeno (4 cm de distancia de nitrógeno líquido por 10 min $\sim -70^\circ\text{C/min}$) y después almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C hasta su análisis (Hernández *et al.*, 2012, Olaciregui *et al.*, 2014, Bruemmer *et al.*, 2002a, Papa *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004).

A las 4 semanas de congelación, las muestras fueron descongeladas colocándolas a 37°C en baño maría por 30 seg (Cary *et al.*, 2004, Clulow *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2012, Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008) y transferidas a tubos plásticos de 1.5 ml incubándolas a 37°C durante su nueva evaluación (Monteiro *et al.*, 2011, Papa *et al.*, 2008).

3.3.7 Análisis estadístico

Se evaluaron las características de los espermatozoides al cumplir el tiempo de refrigeración en horas (2, 24, 48, 72 y 96 horas) y posterior a la descongelación; se

obtuvieron estadísticos descriptivos de cada evaluación en porcentajes y fueron expresados como medias \pm desviación estándar. Se realizó prueba de Shapiro Wilk para normalidad y de Levene para homocedasticidad; si se encontró evidencia estadística para poder modelar los datos de forma normal se aplicó una prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía para los tratamientos, siguiendo el modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_i$$

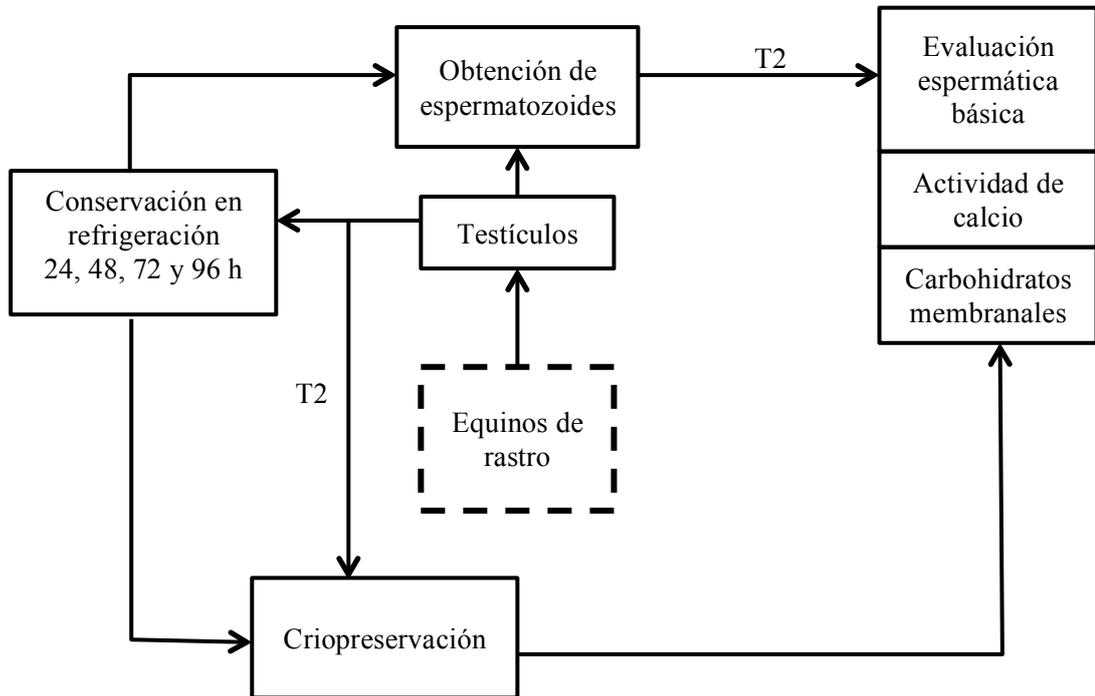
De encontrarse diferencias significativas se utilizó una prueba de Tukey para la diferencia de medias.

Para saber si había diferencias significativas antes y después del proceso de criopreservación se realizó una prueba t de Student para muestras pareadas.

En caso de que no se encontrara evidencia estadística suficiente que indicara que los datos se pudieran modelar de forma normal se utilizó una prueba de Kruskal Wallis para la comparación de medias de los tratamientos y una prueba de Wilcoxon para las diferencias antes y después de congelar.

Todas las pruebas estadísticas se hicieron con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el programa estadístico RStudio® Versión 1.0.136 – © 2009-2015 para Macintosh.

3.4 Diseño experimental



CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Evaluación espermática básica

En el cuadro 3 se observan los resultados de peso de testículos, los cuales tuvieron en promedio 124.41 ± 44.94 g; del epidídimo completo de 16.46 ± 3.46 g y de 5.71 ± 1.41 g en la cola del epidídimo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso post-mortem promedio (g) de testículo, epidídimo y cola epididimaria equinos

	PT	ED	CD
Media % \pm EE	124.413 ± 7.823	16.463 ± 0.602	5.705 ± 0.245
Desviación estándar	44.937	3.460	1.410
Mínimo	11.555	9.311	3.389
Máximo	210	22.695	9.029

PT = Peso total del testículo con epidídimo completo y 3 cm de conducto deferente; ED = Peso del epidídimo completo con 3 cm de conducto deferente; CD = Peso de la cola del epidídimo con 3 cm de conducto deferente.

4.1.1 Movilidad total y progresiva

En espermatozoides obtenidos de epidídimo después de cumplir el tiempo de refrigeración se puede apreciar un patrón descendente a mayor tiempo de refrigeración en movilidad total y progresiva, tanto antes como después del proceso de congelación; la movilidad total fue en promedio de $68.33\% \pm 6.01$ (media \pm EE), $48.75\% \pm 8.54$, $28.67\% \pm 13.38$, $29.17\% \pm 12.41$ y $17.86\% \pm 7.55$ a las 2, 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración respectivamente; con un mínimo/máximo de 50/80, 10/80, 0/70, 0/80 y 0/50 porciento para los mismos tiempos (Cuadro 4). No se encontró evidencia estadística suficiente ($p < 0.05$) para decir que los datos se pudieran modelar de forma normal por lo que se realizó prueba de Kruskal Wallis encontrándose diferencias significativas entre los espermatozoides refrigerados 2 horas y los que permanecieron 48, 72 y 96 horas, siendo menor en estos tres grupos; no se aprecia diferencia entre refrigerar 24, 48 o 72 horas en la movilidad total, ni entre hacerlo 72 o 96 horas ($p < 0.05$).

Al evaluar la movilidad progresiva se encontró un porcentaje de 36.67 ± 7.60 , 24.38 ± 7.04 , 16.67 ± 9.19 , 20.33 ± 9.87 y 8.86 ± 5.47 a las 2, 24, 48, 72 y 96 horas de *post-mortem* respectivamente; con un porcentaje mínimo/máximo de 20/70, 0/60, 0/50, 0/60 y 0/40 en los mismos tiempos (Cuadro 4). No se encontró evidencia estadística suficiente ($p < 0.05$) para decir que los datos se pudieran modelar de forma normal por lo que se realizó prueba de Kruskal Wallis encontrando diferencias significativas entre la movilidad

progresiva de espermatozoides refrigerados 2 y 96 horas ($p < 0.05$), siendo menor en este último grupo.

Después del proceso de congelación se observó un descenso de la movilidad espermática de más del 50% en la mayoría de los tratamientos (Cuadro 5), obteniéndose para la movilidad progresiva mínimos de cero para todos los tratamientos y máximos de 10, 30, 5, 30 y 5% en los grupos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas *post-mortem* respectivamente, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en el grupo de tratamiento de 96 horas mostrando un menor porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo en comparación con los grupos de 2, 24 y 72 horas, las mismas diferencias se encontraron para la movilidad total espermática.

El análisis de t-Student mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la media de movilidad total en los grupos de 2 y 24 horas *post-mortem* antes y después del proceso de criopreservación (Figura 4), con una disminución importante de los porcentajes de espermatozoides móviles, en comparación de la movilidad progresiva, donde solo se encontró diferencia en el grupo de 2 horas, disminuyendo a valores cercanos a 5%.

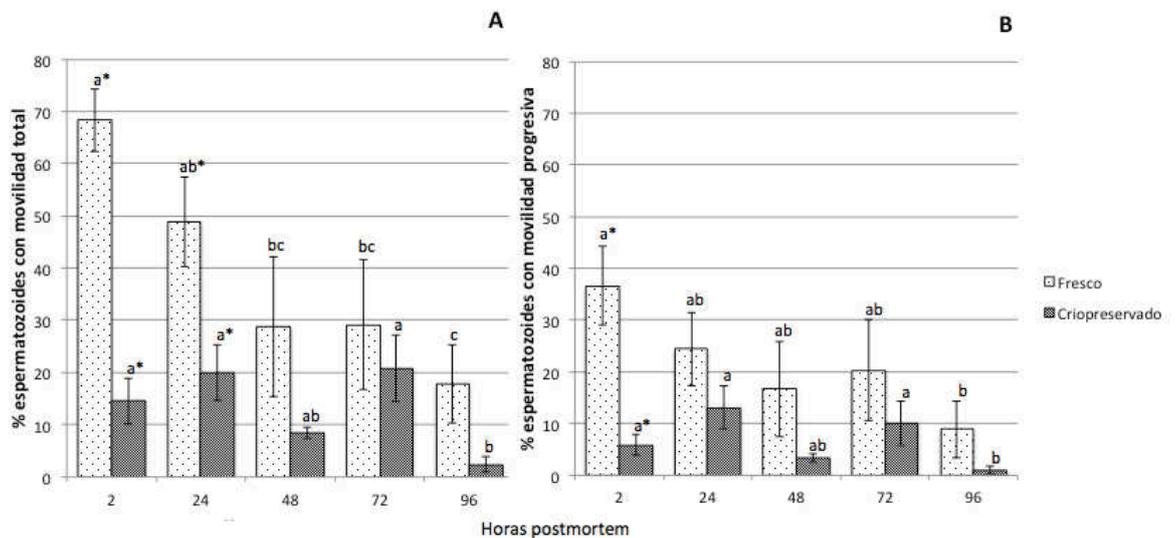


Figura 4. Gráfico de la movilidad total y progresiva de espermatozoides epididimales equinos a diferentes horas postmortem en fresco y después del proceso de criopreservación. A) Gráfico del porcentaje de movilidad total, que muestra el descenso a mayor horas postmortem en espermatozoides obtenidos en fresco, a diferencia de los evaluados postcriopreservación que muestra un descenso a las 48 y 96 horas; B) Gráfico del porcentaje de movilidad progresiva, que muestra el mismo patrón que el gráfico A. Literales diferentes en cada evaluación (fresco o criopreservado) y presencia de asteriscos en los tiempos de evaluación, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.

Tx	MP		MT		VIA	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	36.67 \pm 7.60 ^a	18.62	68.33 \pm 6.01 ^a	14.72	79.67 \pm 1.54 ^b	3.78
24 h (n=8)	24.38 \pm 7.04 ^{ab}	19.90	48.75 \pm 8.54 ^{ab}	24.16	90.25 \pm 1.00 ^a	2.82
48 h (n=6)	16.67 \pm 9.19 ^{ab}	22.51	28.67 \pm 13.38 ^{abc}	32.78	78.17 \pm 4.24 ^b	10.38
72 h (n=6)	20.33 \pm 9.87 ^{ab}	24.18	29.17 \pm 12.41 ^{bc}	30.40	73.00 \pm 3.42 ^b	8.37
96 h (n=7)	8.86 \pm 5.47 ^b	14.46	17.86 \pm 7.55 ^c	19.97	70.71 \pm 5.29 ^b	14.01

MP= movilidad progresiva, MT= movilidad total, VIA= espermatozoides vivos, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimarios equinos Post-criopreservados, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF, a diferentes horas post-mortem.

Tx	MP		MT		VIA	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	5.84 \pm 2.01 ^a	4.92	14.50 \pm 4.35 ^a	10.65	32.17 \pm 4.35 ^{ab}	10.67
24 h (n=8)	13.13 \pm 4.22 ^a	11.93	20.00 \pm 5.35 ^a	15.12	42.50 \pm 3.84 ^{ab}	10.85
48 h (n=6)	3.33 \pm 0.84 ^{ab}	2.07	8.33 \pm 1.05 ^{ab}	2.58	30.84 \pm 5.42 ^{ab}	13.27
72 h (n=6)	10.00 \pm 4.28 ^a	10.49	20.83 \pm 6.38 ^a	15.63	49.17 \pm 5.42 ^a	6.52
96 h (n=7)	1.00 \pm 0.72 ^b	1.91	2.43 \pm 1.45 ^b	3.82	25.71 \pm 5.47 ^b	14.48

MP= movilidad progresiva, MT= movilidad total, VIA= espermatozoides vivos, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

4.1.2 Espermatozoides vivos

El mayor porcentaje de espermatozoides vivos se observó en espermatozoides refrigerados por 24 horas con una media de 90.25% \pm 1 y un mínimo/máximo de 86/94 %, las otras horas de refrigeración al igual que la movilidad, muestran un patrón descendente entre más tiempo pasen conservados a 4° C, con una media de 79.67 \pm 1.54, 78.17 \pm 4.24, 73.00 \pm 3.42 y 70.71 \pm 5.29 a las 2, 48, 72 y 96 horas respectivamente y un promedio mínimo/máximo de 35/85, 40/77, 57/84 y 58/79 en las mismas horas (Cuadro 4).

No se encontró evidencia estadística ($p < 0.05$) para decir que sus varianzas fueran homogéneas, por lo que se realizó una prueba de Kruskal Wallis para comparar las medias y se encontró diferencia significativa en el tratamiento de 24 horas y el resto de tratamientos ($p < 0.05$).

Después del proceso de congelación se apreció al igual que con la movilidad espermática un descenso de más del 50% en la mayoría de los tratamientos a excepción del grupo que estuvo refrigerado por 72 horas cuyo descenso fue del 32.64% (Cuadro 5). Los mínimos encontrados fueron 21, 30, 20, 41 y 4% para los tratamientos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas *post-mortem* respectivamente y máximos de 46, 66, 54, 59 y 44% para los mismos tratamientos, con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de 72 y 96 horas. Se pudo observar diferencias ($p < 0.05$) en todos los grupos de tratamiento antes y después del proceso de criopreservación (Figura 5).

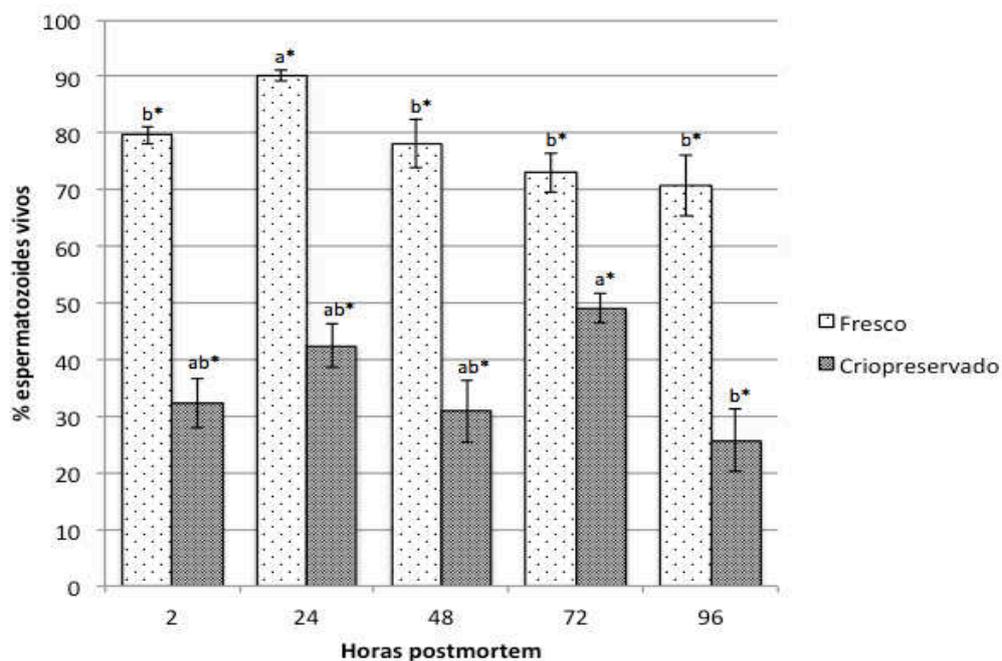


Figura 5. Gráfico del porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos de epidídimo a diferentes horas postmortem antes y después del proceso de criopreservación. Literales diferentes en cada evaluación (fresco o criopreservado) y presencia de asteriscos en cada grupo de tratamiento indica diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.1.3 Morfología espermática

La morfología de los espermatozoides fue normal en más del 62% de los espermatozoides en todos los tratamientos y no se apreciaron diferencias significativas, siendo el grupo de 72 horas *post-mortem* el que mayor porcentaje de normalidad presentó (Cuadro 6). Se encontró un mínimo de espermatozoides normales de 35, 24, 40, 57 y 58% para los tratamientos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente y un máximo de 85, 93, 77, 84 y 79% para las mismas horas. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.

Cuadro 6. Media porcentual (\pm EE) de la morfología de espermatozoides epididimarios equinos frescos a diferentes tiempos *post-mortem*, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA.

Tx	Normal Media % \pm EE	Anormalidades Primarias				Anormalidades Secundarias			
		GC	DCa	Macro	Micro	CoD	CoE	CaD	Glo
2 h	67.0 \pm 7.59	22.7 \pm 6.74 ^{ab}	0.5 \pm 0.34	0.0 \pm 0.00	0.2 \pm 0.17	4.0 \pm 1.32	0.8 \pm 0.31 ^{ab}	4.5 \pm 1.18 ^{ab}	0.3 \pm 0.21
24 h	62.3 \pm 7.87	30.8 \pm 7.26 ^a	0.0 \pm 0.00	0.4 \pm 0.18	0.9 \pm 0.44	3.4 \pm 0.84	0.6 \pm 0.63 ^b	1.6 \pm 0.46 ^c	0.1 \pm 0.13
48 h	62.5 \pm 6.24	22.3 \pm 5.55 ^{ab}	0.2 \pm 0.17	0.2 \pm 0.17	1.7 \pm 1.28	6.3 \pm 2.94	4.2 \pm 2.50 ^{ab}	2.2 \pm 1.14 ^{bc}	0.5 \pm 0.50
72 h	70.7 \pm 6.24	18.0 \pm 4.52 ^{ab}	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	6.0 \pm 1.24	1.5 \pm 0.50 ^{ab}	3.7 \pm 0.49 ^{ab}	0.2 \pm 0.17
96 h	67.7 \pm 2.66	12.3 \pm 1.89 ^b	0.1 \pm 0.14	0.4 \pm 0.43	0.7 \pm 0.29	9.4 \pm 2.98	2.7 \pm 0.92 ^a	5.7 \pm 0.92 ^a	0.8 \pm 0.34

GC= gota citoplasmática, DCa= doble cabeza, Macro= cabeza macroscópica, Micro= cabeza microscópica, CoD= cola doblada, CoE= cola enrollada, CaD= cabeza desprendida, Glo= globozoospermia, EE= error estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las anomalías fueron clasificadas en primarias y secundarias, dentro de las primeras se encontró: 1) Gota citoplasmática, 2) Doble cabeza, 3) Cabeza macroscópica, y 4) Cabeza microscópica. Las anomalías secundarias fueron: 1) Cola doblada, 2) Cola enrollada, 3) Cabeza desprendida, y 4) Globozoospermia.

El total de anomalías primarias en espermatozoides epididimarios equinos en fresco representaron el 23.30, 32.00, 24.30, 18.00 y 13.60% para los tratamientos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración *post-mortem* respectivamente.

La anomalía primaria que se encontró con mayor frecuencia fue: la presencia de Gota citoplasmática de localización caudal, en ambas evaluaciones (frescos y postcriopreservados), aunque en menores porcentajes en espermatozoides descongelados (Cuadro 6 y 7), donde en espermatozoides frescos se encontró un mínimo de 7, 3, 4, 5 y 6% para los mismos tratamientos respectivamente y un máximo de 50, 70, 45, 36 y 20%, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los espermatozoides obtenidos de testículos refrigerados por 24 horas y los que estuvieron 96 horas y se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el antes y el después de descongelar en todos los grupos de tratamiento donde al descongelar los porcentajes de gota citoplasmática disminuyeron en más del 50% en todos los casos a excepción del tratamiento de 72 horas *post-mortem* que descendió solo un 20.38% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Media porcentual (\pm EE) de la morfología de espermatozoides epididimarios equinos Post-criopreservados a diferentes tiempos *post-mortem*, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.

Tx	Normal Media % \pm EE	Anomalías Primarias				Anomalías Secundarias			
		GC	DCa % \pm EE	Macro	Micro	CoD	CoE % \pm EE	CaD	Glo
2 h	77.8 \pm 5.65 ^{ab}	8.3 \pm 4.14 ^{ab}	0.7 \pm 0.33 ^a	0.0 \pm 0.00	1.5 \pm 0.9 ^{ab}	7.5 \pm 1.09	1.0 \pm 0.37 ^c	2.7 \pm 0.5 ^{ab}	0.7 \pm 0.49 ^b
24 h	76.5 \pm 2.35 ^{ab}	11.5 \pm 1.18 ^{ab}	0.0 \pm 0.00 ^b	0.1 \pm 0.13	2.4 \pm 0.68 ^a	6.0 \pm 1.58	0.6 \pm 0.38 ^c	2.4 \pm 0.71 ^a	0.5 \pm 0.27 ^b
48 h	85.0 \pm 2.85 ^a	3.7 \pm 1.23 ^b	0.0 \pm 0.00 ^b	0.2 \pm 0.17	0.5 \pm 0.34 ^b	4.7 \pm 1.71	1.7 \pm 0.9 ^{bc}	2.2 \pm 0.95 ^a	2.2 \pm 0.65 ^a
72 h	67.2 \pm 2.73 ^b	14.3 \pm 1.89 ^a	0.0 \pm 0.00 ^b	0.0 \pm 0.00	0.7 \pm 0.3 ^{ab}	8.5 \pm 1.31	3.3 \pm 0.9 ^{ab}	4.8 \pm 1.1 ^{ab}	1.2 \pm 0.5 ^{ab}
96 h	75.6 \pm 3.85 ^{ab}	4.3 \pm 1.51 ^b	0.0 \pm 0.00 ^b	0.4 \pm 0.30	0.6 \pm 0.3 ^{ab}	7.6 \pm 2.68	4.3 \pm 0.78 ^a	5.9 \pm 0.77 ^b	1.4 \pm 0.5 ^{ab}

GC= gota citoplasmática, DCa= doble cabeza, Macro= cabeza macroscópica, Micro= cabeza microscópica, CoD= cola doblada, CoE= cola enrollada, CaD= cabeza desprendida, Glo= globozoospermia, EE= error estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las anomalías secundarias en los espermatozoides epididimarios equinos en fresco representaron el 9.70, 5.80, 13.20, 11.30 y 18.70% para los tratamientos de 2, 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente, donde las colas dobladas fue la anomalía encontrada con mayor frecuencia, seguida de cabezas desprendidas (Cuadro 6). A diferencia de las anomalías primarias solo se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre las medias, antes y después de congelar, en el grupo de 72 horas *post-mortem*, con un mayor porcentaje de frecuencia de estas anomalías después de descongelar. Después del proceso de congelación se encontraron 11.80, 9.50, 10.70, 17.80 y 19.10% de anomalías

secundarias para los mismos tratamientos, donde las anormalidades mayormente encontradas fueron las mismas que antes de congelar (Cuadro 7); en específico para cada anormalidad secundaria, solo se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre el antes y el después de descongelar en la presencia de globozpermia en el grupo de 72 horas *post-mortem*.

4.2 Actividad de calcio

En la evaluación con Clortetraciclina (CTC) se encontraron cuatro patrones de fluorescencia color verde brillante (Figura 6):

- T:** con fluorescencia uniforme en toda la cabeza;
- A:** libre de fluorescencia en la región post acrosomal;
- PA:** con fluorescencia en la región postacrosomal; y
- SF:** cabeza libre de fluorescencia.

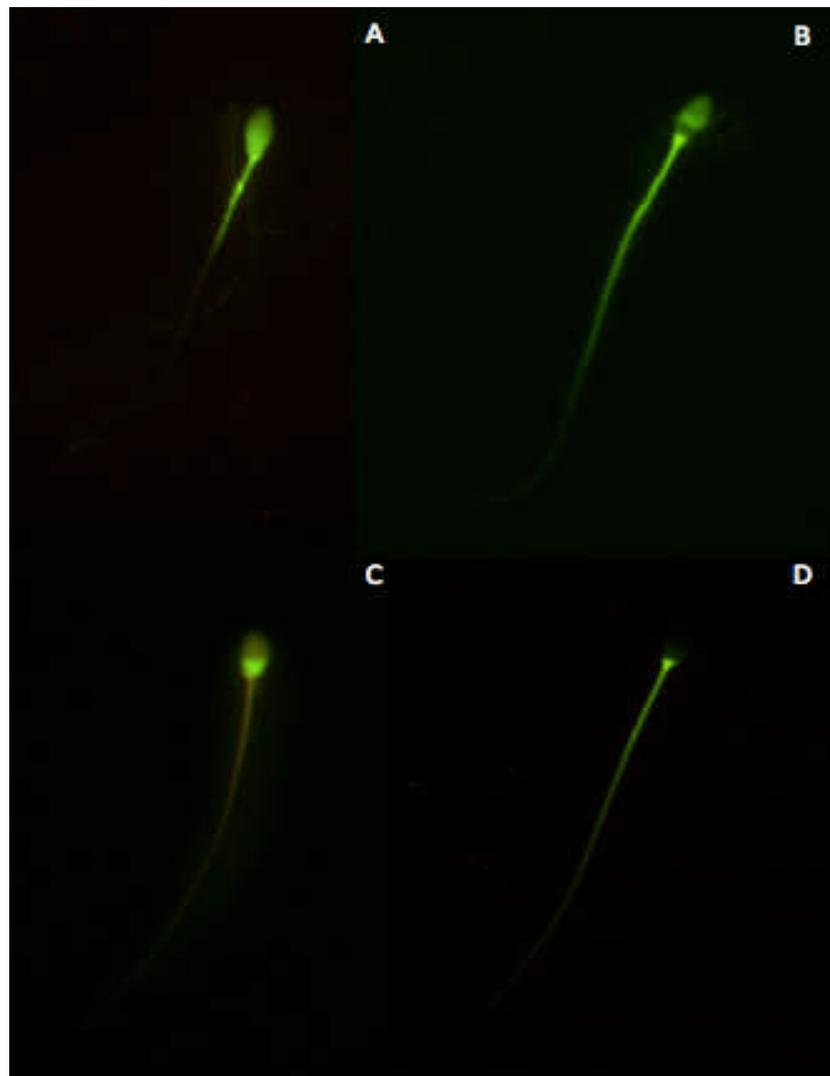


Figura 6. Patrones de fluorescencia con CTC en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas post-mortem. A: Fluorescencia verde brillante uniforme en toda la cabeza (T); B: Fluorescencia en región acrosomal (A); C: Fluorescencia en región postacrosomal (PA); y D: Sin fluorescencia en la cabeza espermática (SF).

Cuadro 8. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de patrones de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) en espermatozoides epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.

Tx	T		A		PA		SF	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	79.00 \pm 7.08 ^a	17.33	4.33 \pm 2.64	6.47	5.33 \pm 2.59 ^c	6.35	11.33 \pm 5.28 ^b	12.93
24 h (n=8)	16.88 \pm 4.42 ^c	12.50	1.38 \pm 1.38	3.89	42.13 \pm 7.87 ^a	22.25	39.63 \pm 7.41 ^b	20.97
48 h (n=6)	58.67 \pm 4.93 ^a	12.08	3.50 \pm 1.96	4.81	24.83 \pm 6.78 ^{bc}	16.62	13.00 \pm 3.06 ^a	7.48
72 h (n=6)	28.33 \pm 6.05 ^b	14.83	1.50 \pm 1.50	3.67	32.83 \pm 6.35 ^{ab}	15.55	37.33 \pm 4.70 ^b	11.50
96 h (n=7)	12.00 \pm 3.09 ^c	8.19	0.57 \pm 0.57	1.51	43.00 \pm 3.82 ^a	10.10	44.43 \pm 4.73 ^b	12.51

T= fluorescencia en toda la cabeza, A= fluorescencia solo en acrosoma, PA= fluorescencia solo en región postacrosomal, SF= sin fluorescencia, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Como se puede apreciar en la Cuadro 8, para espermatozoides en fresco el patrón con mayor frecuencia fue el “T”, guardando una relación inversa proporcional con el patrón de fluorescencia “PA” y el “SF”. Además son evidentes las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los patrones “T” y “SF” donde el primero tienen mayor frecuencia en los grupos de 2 y 48 horas, que el resto de los tratamientos y el patrón “SF” tiene menor porcentaje en estos grupos.

Después del proceso de congelación el patrón “T” descendió en los tratamientos de 2, 48 y 72 horas *post-mortem* 48.49% en promedio y los otros dos tratamientos aumentaron en 104.80% en promedio, estos descensos se dieron en relación con el aumento en los patrones “PA” y “SF”. Con diferencias significativas ($p < 0.05$) solo en el patrón “SF” en el tratamiento de 2 horas presentándose en menor frecuencia que el resto (Cuadro 9).

La comparación entre el antes y el después de criopreservar mostró en el grupo de 2 horas *post-mortem* diferencia en el patrón T y PA, con un descenso del 52% en el patrón T y un aumento de 800% en el patrón PA, al descongelar, efecto parecido también fue observado en el grupo de 48 horas (descenso del 60% del patrón T e incremento de 65% en PA) y 72 horas (descenso del 42% del patrón T e incremento de 37% en PA) aunque este último sin ser significativo ($p > 0.05$) (Figura 7).

Cuadro 9. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de patrones de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) en espermatozoides epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas post-mortem diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.

Tx	T		A		PA		SF	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	37.50 \pm 3.36	8.24	0.00 \pm 0.00	0.00	48.00 \pm 5.20	12.74	14.50 \pm 2.29 ^b	5.61
24 h (n=8)	30.75 \pm 5.76	16.30	1.25 \pm 0.90	0.90	35.38 \pm 4.74	13.39	32.63 \pm 5.73 ^a	16.20
48 h (n=6)	23.33 \pm 8.77	21.49	0.00 \pm 0.00	0.00	41.00 \pm 5.67	13.91	35.67 \pm 3.66 ^a	8.96
72 h (n=6)	16.50 \pm 1.54	3.78	0.33 \pm 0.21	0.21	44.83 \pm 6.09	14.92	38.00 \pm 6.80 ^a	16.67
96 h (n=7)	27.29 \pm 8.63	22.84	0.57 \pm 0.57	0.57	31.57 \pm 9.43	24.95	37.57 \pm 9.20 ^a	24.34

T= fluorescencia en toda la cabeza, A= fluorescencia solo en acrosoma, PA= fluorescencia solo en región postacrosomal, SF= sin fluorescencia, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

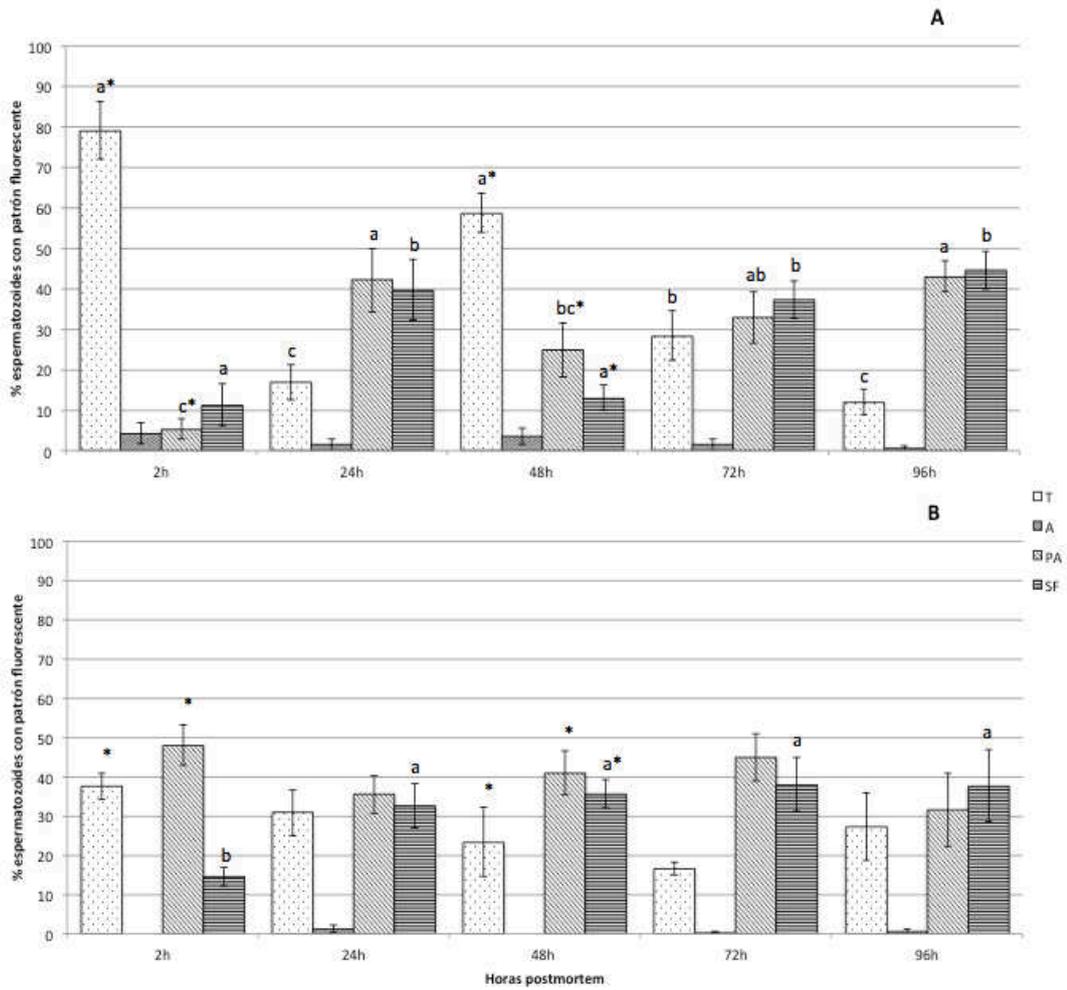


Figura 7. Gráfico del porcentaje de frecuencia de los patrones fluorescentes encontrados en espermatozoides epididimales equinos a diferentes tiempos postmortem marcados con CTC antes y después del proceso de criopreservación. Todo= fluorescencia en toda la cabeza espermática, Acrosoma= fluorescencia solo en la zona acrosomal sin fluorescencia en el resto de la cabeza, Postacrosoma= fluorescencia en región postacrosomal sin fluorescencia en zona apical, Nada= ausencia total de fluorescencia. A) Gráfico que muestra los resultados en espermatozoides obtenidos en fresco; B) Gráfico de la frecuencia encontrada después del proceso de criopreservación. Literales diferentes dentro del mismo grupo de tratamiento y presencia de asteriscos en el mismo patrón/grupo en gráficos A y B, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.3 Distribución de carbohidratos membranales

4.3.1 Residuos de manosa y galactosa

El marcaje de espermatozoides con la lectina PSA-FITC mostró 7 patrones de fluorescencia ():

SF: sin presencia de fluorescencia o fluorescencia casi imperceptible;

Acro: fluorescencia total o punteada en la región acrosomal;

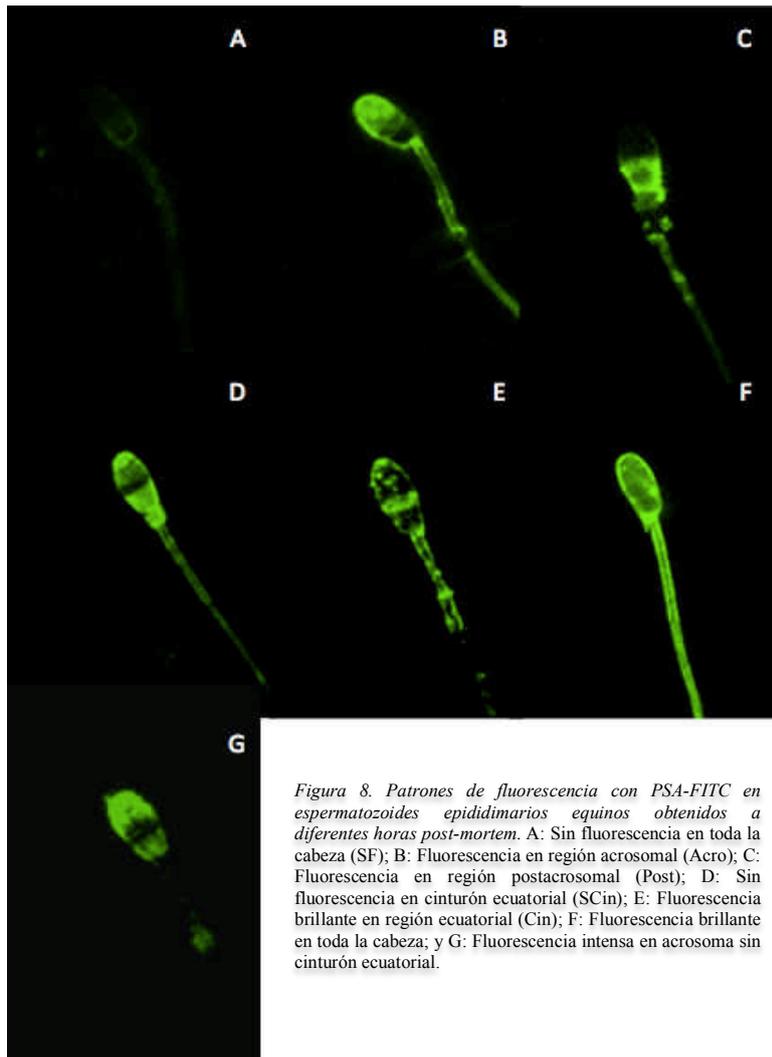
AcroSC: Fluorescencia intensa en acrosoma sin cinturón ecuatorial evidente;

Post: Fluorescencia intensa en zona postecuatorial;

SCin: Fluorescencia en toda la cabeza con ausencia de esta en región ecuatorial;

Cin: fluorescencia solamente en región ecuatorial;

T: Fluorescencia uniforme o punteada en toda la cabeza



El patrón con mayor frecuencia encontrado antes del proceso de criopreservación fue “SF” (Cuadro 10), encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento de 2 horas y los grupos de 24 y 48 horas *post-mortem*, siendo menor el porcentaje en estos grupos. El siguiente patrón en frecuencia fue el de fluorescencia en el acrosoma.

Después del proceso de congelación el patrón “SF” aumenta su frecuencia en todos los grupos siendo hasta más del 200% en el grupo de 72 horas *post-mortem*, sin encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, situación similar sucede con el patrón “T” con aumentos aún mayores (Cuadro 11).

Es evidente que después del proceso de congelación los porcentajes de frecuencia de los patrones con fluorescencia descienden o incluso desaparecen, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el antes y el después en algunos patrones y tratamientos específicos (Figura 9), como es el caso del patrón “AcroSC”, desapareciendo en todos los grupos y el patrón “SCin”; desaparece en el grupo de 2 y 24 h *post-mortem*; por lo tanto el patrón “SF” aumenta en relación a estos descensos, aunque no de manera significativa ($p > 0.05$) para el grupo de 2 horas *post-mortem*, incluso en este mismo grupo es el único que se puede apreciar un aumento significativo de frecuencia del patrón “Post” y “T” después de descongelar, pues aunque en este último patrón se pudo apreciar un aumento en todos los tratamientos, excepto en el de 24 horas donde se tuvo un efecto contrario, sólo en el grupo de 2 horas se encontró significancia.

Cuadro 10. Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina *Pisum Sativum* agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (PSA-FITC) en espermatozoides epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas *post-mortem*.

	SF	Acro	AcroSC	Post	SCin	Cin	T
2 h (n=6)	66.3 \pm 17.33 ^a	8.3 \pm 5.35 ^b	6.3 \pm 6.33	0.3 \pm 0.21 ^c	17.2 \pm 11.4 ^{ab}	0.8 \pm 0.65	0.7 \pm 0.42 ^c
24 h (n=8)	30.8 \pm 12.55 ^b	12.8 \pm 3.83 ^b	0.3 \pm 0.25	14.6 \pm 4.39 ^{ab}	9.1 \pm 3.67 ^{ab}	0.5 \pm 0.50	32.0 \pm 10.33 ^a
48 h (n=6)	39.2 \pm 6.27 ^{ab}	18.8 \pm 7.22 ^{ab}	0.0 \pm 0.00	28.8 \pm 9.14 ^a	2.2 \pm 1.38 ^b	1.7 \pm 0.56	9.3 \pm 3.74 ^{ab}
72 h (n=6)	21.0 \pm 5.23 ^b	45.5 \pm 11.43 ^a	6.0 \pm 6.00	6.0 \pm 1.59 ^b	16.5 \pm 6.01 ^a	2.3 \pm 1.80	2.7 \pm 0.92 ^{bc}
96 h (n=7)	45.4 \pm 7.29 ^{ab}	20.9 \pm 5.96 ^{ab}	2.7 \pm 1.80	8.3 \pm 2.38 ^b	16.9 \pm 3.81 ^a	0.2 \pm 0.14	5.7 \pm 1.74 ^{ab}

SF= sin fluorescencia, Acro= fluorescencia solo en acrosoma, AcroSC= fluorescencia intensa en acrosoma, con ausencia en cinturón ecuatorial, Post= fluorescencia solo en región postacrosomal, SCin= sin fluorescencia en cinturón ecuatorial, T= fluorescencia en toda la cabeza, EE= error estándar, Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 11. Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina *Pisum Sativum* agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (PSA-FITC) en espermatozoides epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas *post-mortem*, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.

	SF	Acro	AcroSC	Post	SCin	Cin	T
2 h (n=6)	74.50 \pm 3.65	7.67 \pm 1.86	0.00 \pm 0.00	5.67 \pm 1.82 ^a	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b	12.17 \pm 3.98
24 h (n=8)	74.75 \pm 4.97	7.13 \pm 3.06	0.00 \pm 0.00	1.25 \pm 0.45 ^b	0.00 \pm 0.00 ^b	0.13 \pm 0.13 ^b	16.75 \pm 5.20
48 h (n=6)	71.33 \pm 5.96	7.17 \pm 4.80	0.00 \pm 0.00	6.33 \pm 1.31 ^a	0.50 \pm 0.22 ^a	0.50 \pm 0.22 ^a	14.17 \pm 2.98
72 h (n=6)	81.17 \pm 3.94	6.50 \pm 1.20	0.00 \pm 0.00	4.33 \pm 0.76 ^a	0.67 \pm 0.67 ^{ab}	0.2 \pm 0.17 ^{ab}	17.17 \pm 3.61
96 h (n=7)	74.57 \pm 10.54	7.00 \pm 3.60	0.00 \pm 0.00	4.29 \pm 2.28 ^{ab}	0.86 \pm 0.86 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^b	13.29 \pm 8.07

SF= sin fluorescencia, Acro= fluorescencia solo en acrosoma, AcroSC= fluorescencia intensa en acrosoma, con ausencia en cinturón ecuatorial, Post= fluorescencia solo en región postacrosomal, SCin= sin fluorescencia en cinturón ecuatorial, Cin= fluorescencia solo en cinturón ecuatorial, T= fluorescencia en toda la cabeza, EE= error estándar, Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

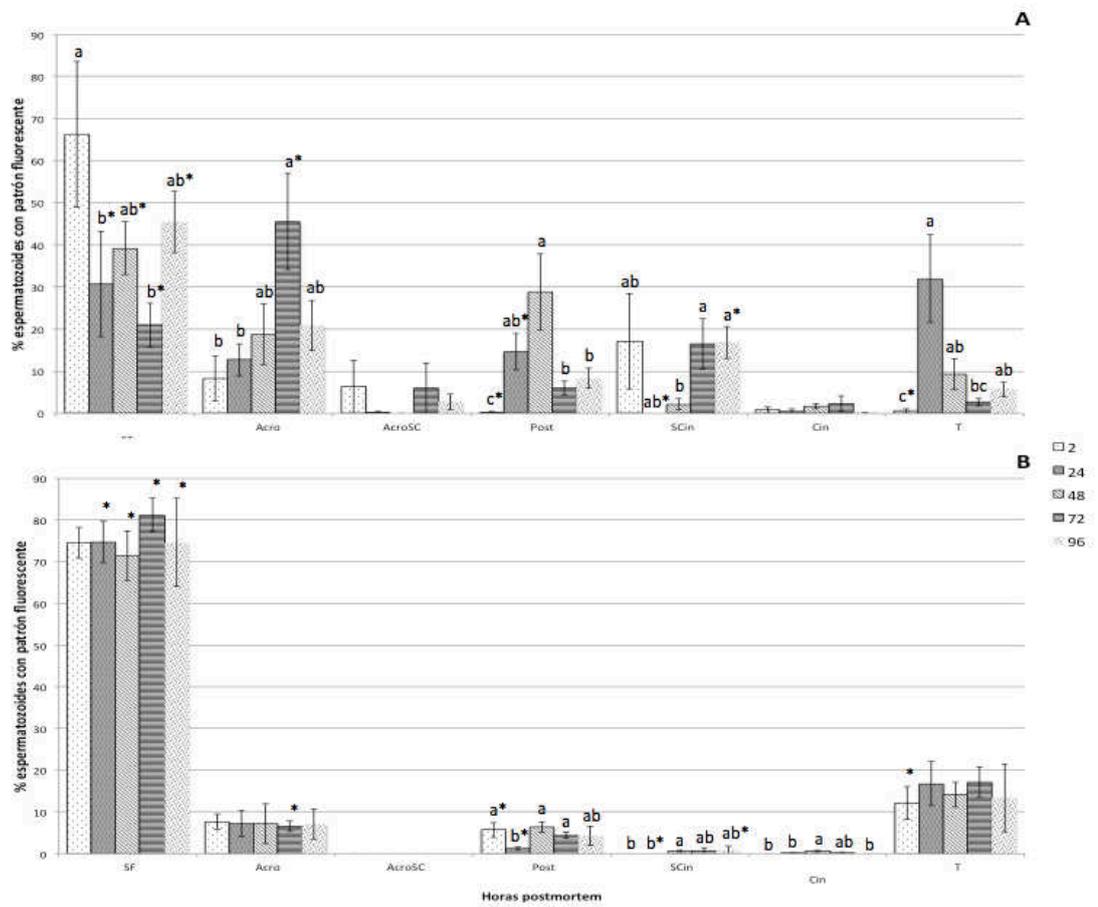


Figura 10. Gráfico de frecuencia (%) de los patrones de fluorescencia con lectina PSA-FICT en espermatozoides epididimales equinos obtenidos a diferentes horas postmortem, antes y después del proceso de criopreservación. A) Frecuencia de patrones antes de congelar; B) Frecuencia de patrones post-descongelación. Literales diferentes dentro del mismo patrón y presencia de asteriscos en el mismo grupo de tratamiento/patrón en gráficos A y B, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.3.2 Ácido siálico y N-acetilglucosamina

El marcaje de espermatozoides con la lectina WGA-FITC mostró 8 patrones de fluorescencia ():

SF: sin presencia de fluorescencia o fluorescencia casi imperceptible;

Acro: fluorescencia total o punteada en la región acrosomal;

AcroSC: Fluorescencia intensa en acrosoma sin cinturón ecuatorial evidente;

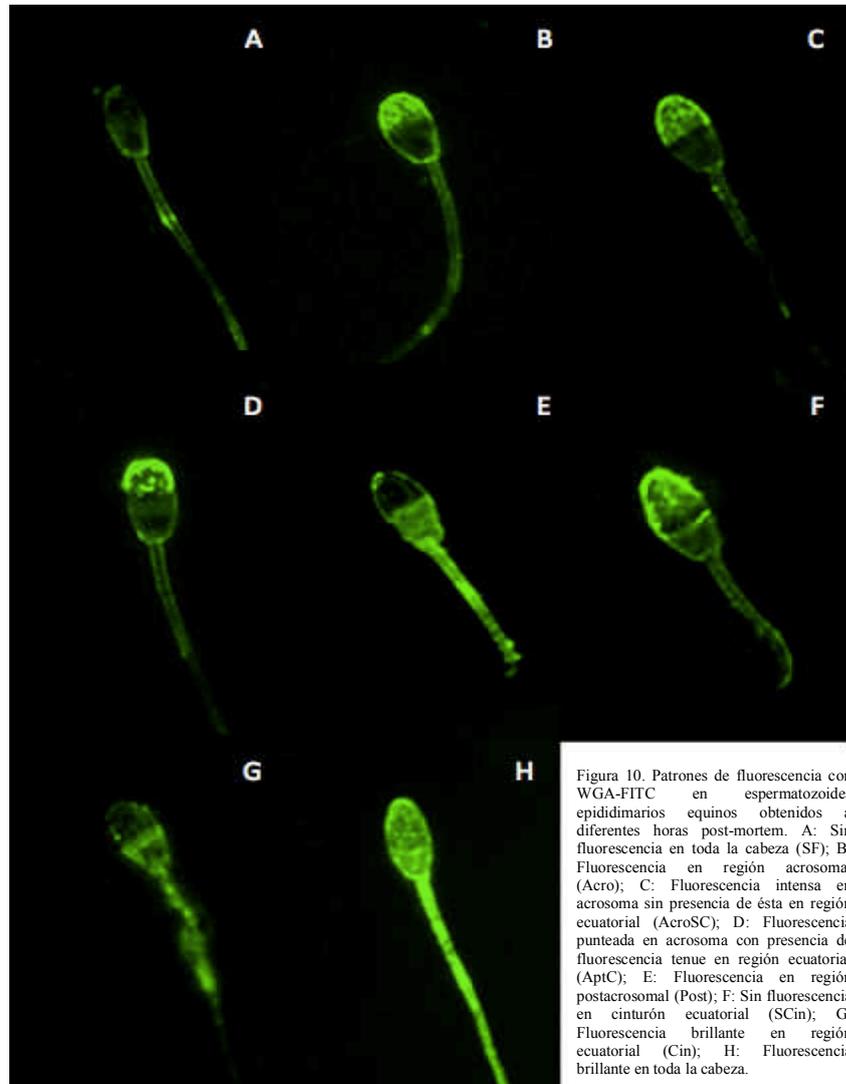
AptC: Fluorescencia punteada en acrosoma con cinturón ecuatorial intenso;

Post: Fluorescencia intensa en zona postecuatorial;

SCin: Fluorescencia en toda la cabeza con ausencia de esta en región ecuatorial;

Cin: fluorescencia solamente en región ecuatorial;

T: Fluorescencia uniforme o punteada en toda la cabeza



El patrón con mayor frecuencia fue el que presentó fluorescencia en todo el acrosoma, siendo mayor en los tratamientos de 2, 72 y 96 horas *post-mortem* (Cuadro 12) y mostrando una relación inversa con el patrón “Post”, “Cin” y “T”.

Después del proceso de congelación el patrón “Acro” continuó siendo el que mayor frecuencia presentó, teniendo un incremento respecto a los valores anteriores en los grupos de 2, 24 y 48 horas, de hasta un 31% en el grupo de 24 horas; y un descenso de sus valores en los dos grupos restantes en promedio del 43%, con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos de 2 y 72 horas *post-mortem* siendo menor en este último grupo (Cuadro 13).

Antes del proceso de congelación se puede observar un incremento gradual a mayor tiempo *post-mortem* en el patrón “Acro”, con porcentajes menores significativamente ($p < 0.05$) entre el grupo de 24 y 48 vs 72 y 96 horas, que después del proceso de criopreservación muestra un efecto inverso (Figura 11). Algunos patrones incluso desaparecen después de dicho proceso (“AptC” y “AcroSC”), provocando el incremento del patrón “SF” de forma significativa ($p < 0.05$).

Cuadro 12. Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina *Triticum vulgaris* agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (WGA-FITC) en espermatozoides epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas *post-mortem*.

	SF	Acro	AcroSC	AptC	Post	SCin	Cin	T
2 h (n=6)	4.5 \pm 2.09	50.2 \pm 10.54 ^{bc}	34.5 \pm 10.85 ^a	1.2 \pm 0.83 ^b	6.7 \pm 2.73	3.0 \pm 2.61 ^{ab}	0.0 \pm 0.00 ^b	0.0 \pm 0.00 ^b
24 h (n=8)	10.0 \pm 4.20	34.8 \pm 7.46 ^c	0.5 \pm 0.50 ^b	0.0 \pm 0.00 ^b	16.8 \pm 6.77	18.1 \pm 6.87 ^a	10.8 \pm 6.73 ^{ab}	9.2 \pm 2.21 ^a
48 h (n=6)	15.0 \pm 4.60	39.2 \pm 9.14 ^c	0.0 \pm 0.00 ^b	0.8 \pm 0.83 ^b	15.5 \pm 5.53	0.7 \pm 0.67 ^b	23.7 \pm 10.72 ^a	5.2 \pm 4.09 ^b
72 h (n=6)	8.5 \pm 2.17	63.8 \pm 4.96 ^{ab}	0.0 \pm 0.00 ^b	20.3 \pm 7.45 ^a	2.5 \pm 1.02	1.0 \pm 0.52 ^{ab}	2.7 \pm 1.36 ^{ab}	1.2 \pm 0.79 ^b
96 h (n=7)	14.1 \pm 2.22	76.3 \pm 2.76 ^a	1.7 \pm 1.41 ^b	0.0 \pm 0.00 ^b	4.9 \pm 1.35	0.3 \pm 0.29 ^b	0.6 \pm 0.30 ^{ab}	2.1 \pm 0.80 ^b

SF= sin fluorescencia, Acro= fluorescencia solo en acrosoma, AcroSC= fluorescencia intensa en acrosoma, con ausencia en cinturón ecuatorial, AptC= fluorescencia punteada en acrosoma con cinturón ecuatorial intenso, Post= fluorescencia solo en región postacrosomal, SCin= sin fluorescencia en cinturón ecuatorial, Cin= fluorescencia solo en cinturón ecuatorial, T= fluorescencia en toda la cabeza, EE= error estándar, Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 13. Media porcentual (\pm EE) de patrones de fluorescencia con lectina *Triticum vulgaris* agglutinin conjugada a isotiocinato de fluoresceína (WGA-FITC) en espermatozoides epididimarios equinos Postcriopreservados a diferentes horas *post-mortem*, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF.

	SF	Acro	AcroSC	AptC	Post	SCin	Cin	T
2 h (n=6)	24.3 \pm 4.56	58.5 \pm 5.70 ^a	0.0 \pm 0.00	0.5 \pm 0.50	10.8 \pm 2.23	1.3 \pm 0.61	1.5 \pm 0.72	3.0 \pm 1.26 ^{ab}
24 h (n=8)	17.5 \pm 5.59	45.5 \pm 3.64 ^{ab}	1.8 \pm 1.15	0.1 \pm 0.13	18.4 \pm 4.55	3.4 \pm 1.58	7.0 \pm 2.41	6.4 \pm 2.20 ^a
48 h (n=6)	24.7 \pm 1.82	40.8 \pm 4.35 ^{ab}	2.0 \pm 0.93	0.0 \pm 0.00	24.2 \pm 3.98	2.0 \pm 0.63	4.8 \pm 1.11	1.5 \pm 0.34 ^b
72 h (n=6)	27.0 \pm 6.37	38.3 \pm 3.25 ^b	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	23.5 \pm 4.86	5.7 \pm 2.55	0.2 \pm 0.56	3.8 \pm 1.56 ^{ab}
96 h (n=7)	25.0 \pm 3.29	41.0 \pm 4.23 ^{ab}	0.1 \pm 0.14	0.3 \pm 0.29	22.6 \pm 2.53	1.1 \pm 0.55	3.7 \pm 1.36	6.1 \pm 1.53 ^a

SF= sin fluorescencia, Acro= fluorescencia solo en acrosoma, AcroSC= fluorescencia intensa en acrosoma, con ausencia en cinturón ecuatorial, AptC= fluorescencia punteada en acrosoma con cinturón ecuatorial intenso, Post= fluorescencia solo en región postacrosomal, SCin= sin fluorescencia en cinturón ecuatorial, Cin= fluorescencia solo en cinturón ecuatorial, T= fluorescencia en toda la cabeza, EE= error estándar, Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

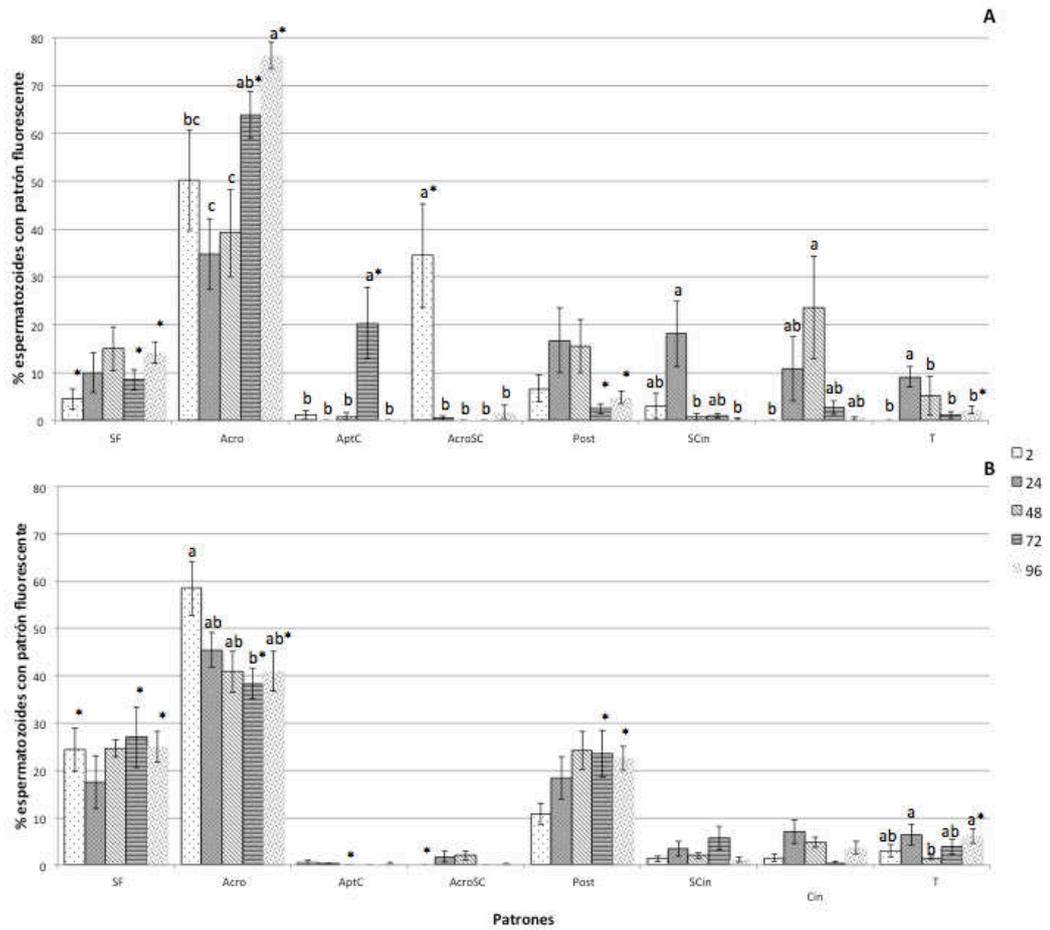


Figura 12. Gráfico de frecuencia (%) de los patrones de fluorescencia con lectina WGA-FICT en espermatozoides epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas postmortem, antes y después del proceso de criopreservación. A) Frecuencia de patrones antes de congelar; B) Frecuencia de patrones post-descongelación. Literales diferentes dentro del mismo patrón y presencia de asteriscos en el mismo grupo de tratamiento/patrón en gráficos A y B, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Las técnicas de reproducción asistida han sido una importante y moderna herramienta que contribuye a los avances de la producción animal, donde el semen de un ejemplar de importancia genética puede ser utilizado para inseminar a varias hembras, maximizando así, la distribución de genes favorables (Bailey *et al.*, 2000, Salazar *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015), eliminando el contacto entre animales y así el riesgo de enfermedades de transmisión sexual; además, la criopreservación le agrega valor a estas técnicas, facilitando el transporte a través de grandes distancias (Wilhelm *et al.*, 1996, Bailey *et al.*, 2000, Fayrer-Hosken *et al.*, 2008), manteniendo la calidad en el semen y la preservación de germoplasma aún después de la muerte del animal (Bailey *et al.*, 2000, Monteiro *et al.*, 2013), que con el uso de espermatozoides epididimarios se nos ve permitido aún después de la castración o muerte del animal, como alternativa para obtener gametos cuando no fue posible recolectar semen (Monteiro *et al.*, 2011, Monteiro *et al.*, 2013, Hernández *et al.*, 2012, Heise *et al.*, 2011).

Aunque la criopreservación de gametos se ha convertido en una importante herramienta para la reproducción asistida (Olaciregui *et al.*, 2014, Salazar *et al.*, 2011, Hernández *et al.*, 2012), y para el sector lechero el desarrollo de ésta parece haberse estabilizado en una gran industria mundial (Bailey *et al.*, 2000, Salazar *et al.*, 2011), para algunos mamíferos esto no es así, debido al gran número de espermatozoides aparentemente infértiles después de congelar y descongelar (Bailey *et al.*, 2000, Salazar *et al.*, 2011, Schembri *et al.*, 2002), siendo el motivo por el cual, por mucho tiempo, la mayoría de las asociaciones internacionales de razas equinas no permitieron el uso de semen congelado (Wilhelm *et al.*, 1996, Olaciregui *et al.*, 2014). Sin embargo, en casos donde se recupere el material genético por espermatozoides epididimarios, es poco probable que existan hembras listas para inseminar en ese momento, por lo tanto, estos espermatozoides deberán ser congelados, para poderlos conservar por un periodo de tiempo indefinido (Armas *et al.*, 2011).

Adicionalmente, en la actualidad la demanda de semen equino criopreservado ha ido en aumento y se ha iniciado una búsqueda por entender los cambios espermáticos durante este proceso, y así mejorar las técnicas de preservación como en otras especies se ha hecho (Wilhelm *et al.*, 1996, Olaciregui *et al.*, 2014), dirigiendo las investigaciones a la preservación de espermatozoides epididimarios para prevenir la pérdida de genética (Monteiro *et al.*, 2011), y aunque, aún no se ha desarrollado una técnica de criopreservación satisfactoria (Bailey *et al.*, 2000), debido a la gran variabilidad individual que esta especie presenta (Olaciregui *et al.*, 2014, Bruemmer *et al.*, 2002a), la búsqueda de técnicas de congelación y composición de diluyentes continua, incluso buscando protocolos para

refrigerar los testículos, después de orquidectomía o muerte, como una ventana de oportunidad para la conservación de germoplasma incluso en especies en peligro de extinción.

Dado que, el epidídimo tiene la función de almacenar espermatozoides hasta la eyaculación, lo vuelve una estructura que nos permite recuperar un gran número de células, incluso mayor que cuando es por eyaculado, usando una vagina artificial (Monteiro *et al.*, 2011, Olaciregui *et al.*, 2014, Hernández *et al.*, 2012). En el presente trabajo se obtuvo una concentración similar a la reportada por otros autores que utilizaron lavado retrogrado para la obtención de espermatozoides (Gonzales *et al.*, 2015, Hernández *et al.*, 2012) o del obtenido por eyaculado (Clulow *et al.*, 2008), aunque menor que la reportada por Cary *et al.* (2004), usando la misma técnica que la utilizada en este trabajo, esto quizás se deba a la misma técnica en sí, pues aunque es un método efectivo, los cortes permitieron la obtención de espermatozoides que se encontraban en los conductos seccionados únicamente, no se dio un periodo de flotación y no se tuvo acceso a todo el reservorio de espermatozoides, aun así, la concentración obtenida se considera aceptable y el método de obtención es sencillo y rápido.

5.1 Características espermáticas básicas

La morfología espermática es importante para mantener altos valores de fertilidad en el equino, pues altos porcentajes de normalidad mantienen la movilidad y capacidades del espermatozoide en condiciones óptimas para una correcta fertilización (Jasko *et al.*, 1990), sin embargo, los resultados sobre esta característica son contradictorios, algunos autores han observado que espermatozoides de eyaculado muestran mayor porcentaje de malformaciones que los obtenidos de epidídimo (Monteiro *et al.*, 2011), mientras que otros reportan lo contrario (Heise *et al.*, 2011), hay estudios previos que reportan porcentajes de morfología normal en espermatozoides obtenidos de epidídimo por técnica de flotación en menor frecuencia que los encontrados en el presente trabajo (Cary *et al.*, 2004) y otros reportan mayores porcentajes que los que nosotros pudimos observar (Hernández *et al.*, 2012).

En lo que si se encuentra concordancia es que, se han reportado diferencias significativas en la morfología normal de espermatozoides de equinos antes y después de congelar (Clulow *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2012, Heise *et al.*, 2011), con porcentajes similares a los que nosotros exponemos aquí (Hernández *et al.*, 2012), en toros la morfometría indica que, después de criopreservar hay reducción del tamaño de la cabeza comparada con los que no han sido congelados, posiblemente siendo el reflejo de una modificación permanente de la arquitectura membranal (Bailey *et al.*, 2000).

La morfología espermática se modifica en criopreservación por haber mayor reactividad de membrana, y aunque está dado por una variabilidad individual, hay que tener

en cuenta que cada estructura espermática tiene una susceptibilidad específica a la criopreservación (Blottner *et al.*, 2001), la pieza principal tiende a sufrir enrollamientos frecuentemente al sufrir un choque térmico, con disminución en su movimiento progresivo como consecuencia (Wrench *et al.*, 2010).

Las anormalidades espermáticas pueden afectar la fertilidad de los equinos (Jasko *et al.*, 1990) y varían entre caballos considerándose importantes si son mayores al 10% del total de espermatozoides (Clulow *et al.*, 2008), en el presente trabajo se encontró un porcentaje en anormalidades mayor, sin embargo cerca del 10% fueron anormalidades secundarias y la principal anormalidad primaria encontrada fue la presencia de gota citoplasmática, siendo mayor en el grupo que estuvo refrigerado solo 24 horas y menor en el grupo de 96 horas, en este punto vale la pena recordar que espermatozoides de eyaculado pasan más tiempo en epidídimo y están en contacto con líquido epididimal y con plasma seminal posteriormente, lo cual juega un rol importante para la eliminación de gota citoplasmática, en toros incluso se ha visto que el fluido vesicular es el que parece removerla (Heise *et al.*, 2011), por lo que nuestros resultados demuestran que efectivamente el líquido epididimal interviene en el proceso de eliminación de gota citoplasmática.

Pudimos observar que después del proceso de congelación ésta anormalidad disminuyó en más del 50% en nuestro estudio, y si bien la presencia de plasma seminal parece tener influencia en la presencia de gota citoplasmática durante el proceso de criopreservación, este no es absolutamente necesario para el proceso (Heise *et al.*, 2011), como pudimos observar los espermatozoides evaluados nunca estuvieron en contacto con plasma seminal. Además, la presencia de gota citoplasmática no tiene especial significancia o impacto negativo en la fertilidad (Heise *et al.*, 2011), por lo que aunque el porcentaje encontrado en nuestro estudio fue alto, esto no debería ser impedimento para el uso de espermatozoides epididimarios para inseminación artificial.

Lo que se puede ver es que los resultados de los estudios sobre si la adición de plasma seminal puede o no ser benéfico para criopreservar espermatozoides son contradictorios (Heise *et al.*, 2011) mientras que algunos como González *et al.* (2015), que encontraron una viabilidad menor al 40.5% al usar plasma seminal para congelar espermatozoides epididimarios, valor cercano al encontrado por Alvarenga *et al.* (2005) en espermatozoides obtenidos de eyaculado, otros no encontraron diferencia en la movilidad o en la integridad membrana de espermatozoides epididimarios con la adición de plasma (Cary *et al.*, 2004, Heise *et al.*, 2011).

En general, las características del semen dependen de muchos factores como la estación del año, actividad sexual previa y variabilidad individual entre caballos (Cary *et al.*, 2004, Kareskoski y Katila, 2008, Monteiro *et al.*, 2013), y la viabilidad y movilidad de los espermatozoides se ve afectada por la edad de los animales, debido al grado de madurez de

las glándulas sexuales accesorias en el macho. En carneros, por ejemplo, la concentración de proteínas en el plasma seminal aumenta significativamente de los 7 a los 13 meses de edad, mejorando la viabilidad y movilidad de los espermatozoides (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008).

Sin embargo, investigaciones han demostrado que la presencia de plasma seminal puede tener efectos negativos sobre la movilidad e integridad membranal y del ADN de espermatozoides equinos refrigerados y congelados (Kareskoski y Katila, 2008, Monteiro *et al.*, 2013, Monteiro *et al.*, 2011), sobre todo de eyaculados a los que no les es removido todo el plasma seminal antes de estos procesos (Kareskoski y Katila, 2008), observándose deterioro de la viabilidad de espermatozoides equinos cuando hay más de 20% de plasma seminal (Monteiro *et al.*, 2013). Esto es debido a que ciertas proteínas en el plasma seminal pueden promover cambios bioquímicos, causando daño en la membrana plasmática (Monteiro *et al.*, 2013), como cambios en la composición de lípidos membranales, resultando en una menor resistencia al choque frío (Monteiro *et al.*, 2011), además, en el plasma seminal de caballos hay una gran concentración de sodio comparado con el de otras especies, lo que puede afectar la calidad espermática, pues altos niveles de Na^{2+} y K^{+} inducen peroxidación lipídica espontánea en la membrana del espermatozoide (Monteiro *et al.*, 2013).

Además, espermatozoides epididimarios muestran menores porcentajes en sus variables evaluadas antes de ser diluidos en un medio extensor que los que provienen de eyaculado mostrando que ambos, el plasma seminal y los diluyentes promueven el metabolismo y movilidad espermática (Monteiro *et al.*, 2011), por lo que los espermatozoides epididimarios son una alternativa funcional a los espermatozoides de eyaculado.

Por otro lado, reportes han demostrado que los testículos refrigerados a 5 °C por 24 horas permite la obtención de espermatozoides capaces de ser criopreservados (Bruemmer *et al.*, 2002a, Monteiro *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015, Hernández *et al.*, 2012), incluso cuando el tejido se encuentra en descomposición (Monteiro *et al.*, 2011), en perros, por ejemplo, se ha logrado obtener espermatozoides viables para criopreservar hasta después de 48 horas *post-mortem* (Armas *et al.*, 2011), nuestros resultados muestran mayores porcentajes de sobrevivencia al obtener espermatozoides a las 24 horas *post-mortem* y si bien el resto de tratamientos mostraron porcentajes de viabilidad menores a éste grupo, entre ellos no mostraron diferencias y se encuentran por valores superiores o similares a lo que algunos autores encontraron como aceptable para congelar (Hernández *et al.*, 2012), sin embargo, también llama la atención que el grupo en el que se encontró el caballo con menor porcentaje de viabilidad fue en el de 24 horas con 35% de espermatozoides vivos solamente y el caballo con el porcentaje mínimo más alto estuvo en el grupo que se mantuvo 96 horas en

refrigeración; algunos autores han concluido que los espermatozoides epididimarios refrigerados muestran mayor resistencia al choque frío, mostrando ser más eficientes para conservar su viabilidad (Cary *et al.*, 2004, Monteiro *et al.*, 2013, Monteiro *et al.*, 2011, Gonzales *et al.*, 2015), sin embargo, otros no han encontrado pruebas de esto (Heise *et al.*, 2011).

Después del proceso de criopreservación se sabe que solo el 50% de los espermatozoides sobreviven (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Hernández *et al.*, 2012), en nuestros grupos de tratamiento después de descongelar, solo el que se mantuvo 72 horas en refrigeración muestra más de este porcentaje de sobrevivencia, siendo también el grupo con más espermatozoides vivos en promedio, por lo que podríamos no rechazar la hipótesis de esta resistencia al frío que parecen tener los espermatozoides epididimarios; incluso otros autores han encontrado valores similares a los aquí mostrados usando el mismo crioprotector (Alvarenga *et al.*, 2005) o utilizando glicerol (Gonzales *et al.*, 2015), aunque, otros reportan porcentajes de sobrevivencia el doble de altos que los nuestros (Olaciregui *et al.*, 2014, Hernández *et al.*, 2012), quizás intervino el tiempo que nos tomaba llegar a laboratorio y el tiempo de estabilización que ellos usaron antes del proceso de criopreservación el cual fue de 2 horas y el de nosotros fue de 30 minutos.

En el presente trabajo los resultados de movilidad total y progresiva muestran una tendencia a disminuir con el incremento del tiempo entre la muerte y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo, siendo significativo el descenso de la movilidad total a partir de 48 horas y el de la movilidad progresiva hasta las 96 horas *post-mortem*, este descenso es progresivo y presenta un pico de aumento en el grupo que estuvo refrigerado por 72, para descender a su nivel mínimo en el siguiente grupo de tratamiento; quizás se deba a la exposición que tuvieron los espermatozoides a la inmovilina, una glicoproteína con alto peso molecular que se ha reportado está presente en el líquido epididimal y aumenta la viscosidad de éste fluido y reduce la movilidad del espermatozoide (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011), lo cual en un estado fisiológico que le sirve al espermatozoides para mantener su metabolismo en niveles basales y activarse una vez se encuentre en el tracto reproductor femenino.

En espermatozoides epididimarios frescos han reportado porcentajes de movilidad progresiva mayores a los que nosotros encontramos (Hernández *et al.*, 2012, Gonzales *et al.*, 2015), aunque, Cary *et al.* (2004) reportan valores similares a los nuestros tanto para movilidad total como progresiva. En eyaculado de carnero un estudio mostró que cuando se refrigera el semen por 24 horas la movilidad progresiva se mantiene en niveles similares a la observada inmediatamente después de obtenida la muestra (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), nosotros no encontramos diferencias ($p > 0.05$) de 2 a 72 horas de refrigeración.

En equinos, se ha visto que espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo muestran mayor porcentaje de movilidad (aunque no significativa) que los de eyaculado (Monteiro *et al.*, 2011, Monteiro *et al.*, 2013), y cuando los testículos o los espermatozoides epididimarios son refrigerados por 24 y 48 horas muestran mayores porcentajes de movilidad total y progresiva ($p < 0.05$) que los de eyaculado (Monteiro *et al.*, 2013) y después del proceso de criopreservación la movilidad de espermatozoides epididimarios sin refrigerar sigue siendo mayor que la de eyaculado ($p > 0.05$) (Monteiro *et al.*, 2011), lo que nosotros encontramos comparando con algunos estudios que evaluaron movilidad de espermatozoides eyaculado es que esto no es así (Fayrer-Hosken *et al.*, 2008, Cary *et al.*, 2004).

Algunos autores no han encontrado diferencias significativas en la movilidad total y progresiva antes y después de congelar espermatozoides de eyaculados de caballo (Clulow *et al.*, 2008, Bruemmer *et al.*, 2002a), mientras que otros si encontraron diferencias en la movilidad progresiva antes y después del proceso en espermatozoides epididimarios (Hernández *et al.*, 2012), con pérdida de movilidad de poco más del 50%, después del proceso de congelación (Dobrinski *et al.*, 1995), igual que en el presente trabajo, donde los porcentajes de movilidad progresiva post-descongelación encontrados fueron menores que los reportados (Hernández *et al.*, 2012) y disminuyó más del 50% en casi todos los grupos. En perros, la movilidad total después del proceso de criopreservación disminuyó desde 79.5 a 52.0%, luego de 72 horas de almacenamiento a 5° C y se concluyó que los valores de calidad espermática muestran un patrón descendente a mayor horas en refrigeración (Armas *et al.*, 2011), en nuestro resultados, los espermatozoides que fueron recuperados a las 72 horas *post-mortem* son los únicos que muestran menos de 50% de pérdida de movilidad, disminuyendo de 29.17 a 20.83% postdescongelación. La movilidad postdescongelación de espermatozoides epididimarios refrigerados (5 °C) por 24 horas reportada por Bruemmer *et al.* (2002), es menor que la que nosotros encontramos en fresco, y la movilidad progresiva en obtenidos por lavado retrógrado post-descongelación es similar a nuestros resultados en algunos estudios (Gonzales *et al.*, 2015) y menor que la reportada por otros (Olaciregui *et al.*, 2014).

El principal factor que produce una disminución en la movilidad de los espermatozoides epididimarios antes de la criopreservación, es el proceso de autólisis como consecuencia del daño celular causado por la hipoxia y anoxia que se produce por la detención del flujo de sangre hacia los tejidos del testículo y epidídimo después de la muerte del animal (Armas *et al.*, 2011)

La movilidad progresiva postdescongelación en el equino debe ser superior al 30% para obtener resultados aceptables de concepción al usar inseminación artificial (Gonzales *et al.*, 2015, Hernández *et al.*, 2012) y el que la movilidad en espermatozoides refrigerados se mantenga se debe a que al bajar la temperatura se reduce la actividad metabólica (Rodríguez-

Almeida *et al.*, 2008, Schembri *et al.*, 2002) y de movilidad y al subir la temperatura de nuevo (30-39 °C), si no hubo daños estructurales causados por un shock térmico (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), sin embargo a pesar de todo pensamiento lógico, algunas investigaciones consideran que la movilidad es un pobre predictor de la fertilidad espermática (Wilhelm *et al.*, 1996, Schembri *et al.*, 2002), en bovinos, por ejemplo, buenas movilidades evaluadas con sistemas computarizados después de descongelar no están correlacionadas con fertilidad y en espermatozoides humanos aún con adecuados porcentajes de movilidad se observa significativo daño en la membrana (Bailey *et al.*, 2000), otros trabajos, exponen que la movilidad total, progresiva y velocidad curvilínea, son los mejores predictores de resistencia al crio-daño al evaluarlos en un momento inicial (Salazar *et al.*, 2011).

Durante la criopreservación la membrana plasmática del espermatozoide es la estructura que más se daña (Bailey *et al.*, 2000, Salazar *et al.*, 2011, Hernández *et al.*, 2012, Armas *et al.*, 2011), éste crio-daño en la membrana podría afectar la habilidad del espermatozoide de interactuar con las células del epitelio oviductal o con la zona pelúcida y por lo tanto contribuir al decremento de fertilidad después de inseminar con espermatozoides que fueron congelados (Dobrinski *et al.*, 1995, Bailey *et al.*, 2000), por lo que las técnicas de inseminación deben estar dirigidas a la inseminación oviductal por laparoscopia (Bailey *et al.*, 2000).

La integridad membranar ha mostrado ser mayor en espermatozoides epididimarios que en los que son de eyaculado en fresco y refrigerados por 24 y 48 horas (Monteiro *et al.*, 2013), incluso antes y después del proceso de criopreservación ($p > 0.05$) (Monteiro *et al.*, 2011, Olaciregui *et al.*, 2014) y no se encontraron cambios de importancia antes y después de la criopreservación en los valores de integridad funcional de membrana durante el tiempo de almacenamiento *post-mortem* (Armas *et al.*, 2011).

Durante el periodo de enfriamiento se ha observado una fase de cambios de transición en la ultraestructura membranar del espermatozoide, dañándolo y disminuyendo su capacidad fertilizante (Wilhelm *et al.*, 1996, Bailey *et al.*, 2000, Dobrinski *et al.*, 1995, Salazar *et al.*, 2011), los principales daños atribuidos han sido la separación de la bicapa lipídica, alteraciones en las propiedades de transportación de agua y por supuesto daño directo en la estructura del acrosoma y la membrana plasmática (Salazar *et al.*, 2011), en toros, se crean regiones libres de partículas (Bailey *et al.*, 2000) en especial en la región acrosomal (Dobrinski *et al.*, 1995) y en cerdos estas zonas son remplazadas por agregados de proteínas, lo que es indicativo de diferente grado y zona de daño entre especies (Bailey *et al.*, 2000)

Es bien sabido que la refrigeración disminuye o detiene la actividad metabólica de los espermatozoides, alargando así su viabilidad (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Monteiro *et al.*, 2013, Bailey *et al.*, 2000) e incluso previene daños en la célula (Monteiro *et al.*, 2013),

sin embargo, la refrigeración y crioconservación también pueden inducir cambios en el espermatozoide similares a los que ocurren durante la capacitación, proceso llamado crio-capacitación (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Fayrer-Hosken *et al.*, 2008, Schembri *et al.*, 2002), lo cual reduce el tiempo que la célula es viable y por lo tanto las tasas de concepción cuando se usa en inseminación artificial (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Fayrer-Hosken *et al.*, 2008, Landim-Alvarenga *et al.*, 2004) y aunque no se sabe con exactitud como sucede esta crio-capacitación, se ha especulado que la criopreservación induce una subletal modificación de la membrana espermática con la consecuente desestabilización de la entrada de calcio a la célula (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004, Bailey *et al.*, 2000), debido a la desestabilización del espermatozoide para mantener su gradiente de concentración iónica (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004); en espermatozoides descongelados de toros se ha visto una mayor expresión de proteínas fosfotirosinas que en espermatozoides frescos, un factor importante durante la capacitación fisiológica (Bailey *et al.*, 2000).

5.2 Actividad de calcio

Durante la capacitación, hiperactivación y la inducción de reacción acrosomal por la zona pelúcida, los niveles de calcio intracelular aumentan de forma fisiológica (Bailey *et al.*, 2000), pues uno de los resultados de la capacitación es el aumento de permeabilidad membranal al calcio, el cual es necesario para la fusión de la membrana plasmática y la membrana externa del acrosoma e iniciar así la reacción (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004). El choque frío destruye la permeabilidad selectiva de la membrana espermática al calcio, por lo que los niveles de calcio intracelular son excesivos, reduciendo así su movilidad e induciendo necrosis (Bailey *et al.*, 2000, Landim-Alvarenga *et al.*, 2004).

La clortetraciclina (CTC) es un antibiótico que se ha usado para evaluar el estado de capacitación espermática en varias especies incluido el caballo, y se pueden observar diferentes patrones de acuerdo al estado de este evento (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Rathi *et al.*, 2001, Schembri *et al.*, 2002, Kaul *et al.*, 2001); presenta la ventaja de no solo identificar la reacción acrosomal sino de dividirla en si el espermatozoide está capacitado o no (Schembri *et al.*, 2002, Kaul *et al.*, 2001). La clortetraciclina neutra fluorescente pasa a través de la membrana celular, creando complejos con Ca^{2+} libre intracelular y esto conduce a un aumento en su intensidad de fluorescencia. La unión preferencial del complejo CTC- Ca^{2+} a las regiones hidrófobas de la membrana espermática resulta en los diferentes patrones de fluorescencia antes descritos (Moein-Vaziri *et al.*, 2014).

Un patrón de fluorescencia total en la cabeza (T) espermática significa la presencia de un espermatozoide intacto que no ha sufrido capacitación ni reacción acrosomal (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Rathi *et al.*, 2001, Schembri *et al.*, 2002), nosotros

encontramos este patrón principalmente en el grupo que solo estuvo refrigerado 2 horas y 48 horas, la frecuencia que encontramos del patrón T a las 2 horas antes de congelar coincide con lo reportado por otros autores (Kaul *et al.*, 2001). A menor sea la frecuencia del patrón T se apreció un aumento en el porcentaje de espermatozoides que han sufrido reacción acrosomal, lo que se muestra con el patrón de fluorescencia solo en región post-acrosomal (PA) o con ausencia de fluorescencia (SF) (Rathi *et al.*, 2001).

El presente experimento muestra que las horas *post-mortem* tienen un importante efecto en la transición de los espermatozoide equinos del patrón T al patrón PA y SF. Pues se pudo observar un gran aumento del patrón PA y SF a mayor tiempo de conservación en refrigeración y menor presencia del patrón T. Después del proceso de congelación solo las muestras que estuvieron refrigeradas por 2 y 48 horas mostraron un descenso significativo del patrón T, pero la proporción de este en todos los tratamientos después de descongelar se mantuvo sin diferencias entre los grupos. No encontramos porcentajes tan bajos como los de Schembri *et al.* (2002) en espermatozoides equinos eyaculados, sobre el patrón T que reporta fue de 3.3%, el porcentaje más bajo que encontramos fue en los espermatozoides que estuvieron refrigerados 72 horas con 16.50%, sin embargo, éstos mismos autores y algunos otros reportan una mayor presencia del patrón A en comparación al patrón PA (Kaul *et al.*, 2001) y en nuestros resultados esto fue a la inversa.

Espermatozoides intactos se encuentran con mayor frecuencia en muestras de espermatozoides eyaculados frescos que en muestras congeladas (Schembri *et al.*, 2002) y en todos estos casos no reportan ausencia de fluorescencia en toda la cabeza espermática, como los altos porcentajes que nosotros encontramos.

Aunque no se sabe con exactitud cómo se fija la CTC a la membrana plasmática, se sabe que es calcio dependiente (Schembri *et al.*, 2002, Rathi *et al.*, 2001, Kaul *et al.*, 2001) y se une a éste en zonas hidrofóbicas de la membrana (Rathi *et al.*, 2001), después de la capacitación, una de las primeras señales de la reacción acrosomal es el cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004), de ahí los patrones que muestra de fluorescencia.

Las ventaja del uso de CTC es que evalúa la etapa final de capacitación independientemente de la reacción acrosomal. Sin embargo, ya que se supone que las fluctuaciones en la distribución de los complejos Ca^{2+} -CTC que se unen a moléculas de fosfolípidos membranales son responsables de los diferentes patrones observados, se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados, ya que cualquier factor que afecte el espectro de absorción de fluorescencia de la CTC o los complejos Ca^{2+} -fosfolípido o la intensidad de fluorescencia de estos complejos podría causar una mala interpretación en el potencial del estado de capacitación de los espermatozoides (Moein-Vaziri *et al.*, 2014).

El problema con la evaluación usando CTC es que este marcador es considerado como lento para reconocer los cambios en el estado de capacitación, sin embargo es igual de eficiente que al usar otros bio-marcadores (Rathi *et al.*, 2001) y es un método directo y de un solo paso que permite la diferenciación del estado de capacitación espermática y saber si ha sufrido o no reacción acrosomal (Kaul *et al.*, 2001), es un método sencillo y de fácil observación, que no requiere incubación.

Un efecto similar a la criopreservación es observado cuando el semen diluido se conserva en refrigeración o en fresco por ≥ 4 horas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), con la disminución de presencia del patrón de fluorescencia compatible con espermatozoides no capacitados ni con reacción acrosomal y el aumento de los otros patrones (Schembri *et al.*, 2002). Con la capacitación prematura se pierde la habilidad del espermatozoide para adherirse a las células epiteliales del oviducto, por lo tanto, el número de gametos funcionales disponibles en el oviducto es menor (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Dobrinski *et al.*, 1997), y la longevidad del espermatozoide disminuye cuando este proceso ha sucedido (Dobrinski *et al.*, 1997).

En semen de carneros se ha visto una interacción proporcional en el aumento del porcentaje de espermatozoides capacitados con acrosoma intacto y el tiempo de preservación en refrigeración siendo mayor en espermatozoides refrigerados por 24 horas que los evaluados en fresco inmediatamente (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), lo que en nuestro estudio no se observó, siendo el grupo de 24 horas de refrigeración el que más frecuencia de patrones compatibles con reacción acrosomal y capacitación presentó.

La motilidad es un parámetro utilizado como factor pronóstico posterior a la capacitación espermática. El patrón PA que se encontró y sobre todo su frecuencia ascendente se ha relacionado con astenozoopermia (Kholkute *et al.*, 1992, Merino *et al.*, 2004), lo cual concuerda con el porcentaje descendente de motilidad espermática y con los valores de mayor frecuencia del patrón PA que se pudo observar en nuestros resultados, sin embargo, es difícil señalar comparaciones por las diferencias de especie principalmente sin mencionar las diferentes formas de manejo.

El aumento de espermatozoides capacitados al refrigerar, se debe a los cambios en la membrana causados por las temperaturas de refrigeración y de congelación usadas para la criopreservación, lo cual aumenta los niveles intracelulares de Ca^{+2} , como ocurre en la capacitación (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008, Landim-Alvarenga *et al.*, 2004).

Hay reportes de espermatozoides epididimales equinos donde solo el $50.2\% \pm 0.8$ se encuentran intactos al ser obtenidos en fresco (Rathi *et al.*, 2001), y a pesar, que el proceso de refrigeración y congelación interrumpen la actividad metabólica espermática y alargan la viabilidad, se puede inducir la capacitación prematura de los espermatozoides, con incluso refrigeración por solo 24 horas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008) y la criopreservación

induce no solo la capacitación, si no también reacción acrosomal, daño membranal y disminución de la motilidad progresiva (Neild *et al.*, 2003), en condiciones experimentales incubando con medios capacitantes esto sucede en tan solo 6 horas, pero no se ha visto relación entre la viabilidad y el estado de capacitación (Moein-Vaziri *et al.*, 2014).

La susceptibilidad de la membrana plasmática durante la fase lipídica de transición esta inversamente relacionada con la proporción de colesterol presente (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004, Bailey *et al.*, 2000), mientras que en espermatozoides de toro y cerdo que muestran una menor cantidad de colesterol en su membrana se ha visto una mayor susceptibilidad al proceso de enfriamiento, en espermatozoides de conejo y humano se ve una menor susceptibilidad (Bailey *et al.*, 2000). La incorporación que se hizo de colesterol a las muestras de equino antes de congelar incrementa el número de espermatozoides con integridad membranal, pues al removerlo después de este proceso, la capacitación y reacción acrosomal pueden ser inducidas (Oliveira *et al.*, 2010), pues el colesterol restringe la movilidad lateral de los componentes membranales, estabilizándola (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004).

Hay reducción de reacción acrosomal al incluir colesterol en el diluyente de criopreservación, quizás por dar una mayor estabilidad a la membrana, afectando la entrada de calcio, por lo que no habría estimulación de actividad de Adenilciclase, previniendo así la capacitación y subsecuentemente la reacción acrosomal (Oliveira *et al.*, 2010), la capacitación induce disminución en la concentración de colesterol en la región externa de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004).

El estado de capacitación no se ve influenciado por el proceso de dilución, empaquetamiento o el tiempo de estabilización, pero si lo hace el proceso de centrifugación y resuspensión en medio de dilución, que disminuye la presencia de espermatozoides intactos, mayor, incluso que después de congelar, pues causa estrés traumático en los espermatozoides equinos (Schembri *et al.*, 2002), en el protocolo de congelación utilizado en el presente trabajo la centrifugación fue usada para lavar después de descongelar y así poder retirar la yema de huevo y resuspender en el mismo medio utilizado antes del proceso de congelación. Se ha sugerido que el resuspender en plasma seminal podría ser la solución a esta capacitación espontánea (Schembri *et al.*, 2002).

Los aumentos intracelulares de calcio en el espermatozoide disminuyen la movilidad espermática así como la viabilidad y presencia de acrosoma intacto (Dobrinski *et al.*, 1997, Landim-Alvarenga *et al.*, 2004), aunque el objetivo de la capacitación es crear un cambio en la movilidad espermática, conocido como hiperactivación (Rathi *et al.*, 2001) y aunque no se sabe con exactitud las acciones específicas del calcio, se ha propuesto que está involucrado en la activación de proacrosina a acrosina previo a la reacción acrosomal. El calcio también activa la adenilación en el sistema AMP ciclase-cíclico, incrementando las

concentraciones de cAMP intracelular (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004, Gadella *et al.*, 2001). Altos porcentajes de calcio pueden no solo estar en la cabeza, sino también en pieza media afectando la función mitocondrial (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004)

Un semen apto para inseminación artificial debe tener al menos 45 a 50% de espermatozoides intactos (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), pues la adhesión de estos al epitelio oviductal modula el aumento de calcio intracelular, permitiendo la conservación de espermatozoides para el momento de la ovulación, lo cual cobra importancia en especies como el caballo donde la fecundación ocurre días después de la inseminación (Dobrinski *et al.*, 1997, Dobrinski *et al.*, 1996, Schembri *et al.*, 2002); aunque en casos donde se utilice espermatozoides criopreservados que muy seguramente presenten altos porcentajes de espermatozoides capacitados, el saber el tiempo exacto de la ovulación podría ser la solución (Schembri *et al.*, 2002).

Una gran proporción de espermatozoides equinos con cambios en los patrones de capacitación se ha observado después de refrigerar y descongelar usando CTC (Neild *et al.*, 2003), y aunque se han descrito de 3 (Rathi *et al.*, 2001) a 6 patrones de fluorescencia en caballos (Neild *et al.*, 2003), los resultados son similares a lo obtenido en este trabajo donde se aprecia un aumento en los porcentajes de patrones compatibles con estado de capacitación y reacción acrosomal a mayor horas *postmortem*, con diferencias significativas en las horas de refrigeración y antes y después de congelar.

5.3 Carbohidratos membranales

En el presente estudio hemos mostrado diferentes patrones de glucosilación en espermatozoides epididimarios equinos en diferentes horas *post-mortem*. Son importantes pues estos dependen de la estructura exterior de la célula, la presencia de glicocálix en espermatozoides de mamíferos les confiere una interface entre el gameto y el medio extracelular, dándole diferentes funciones (Desantis *et al.*, 2010, Vázquez *et al.*, 1996), entre las que destaca el reconocimiento inicial entre el espermatozoide y la zona pelúcida del óvulo (Vázquez *et al.*, 1996); después de la monta natural los espermatozoides ascienden hasta el istmo del oviducto de la hembra donde se forma un reservorio de estos uniéndose al epitelio del oviducto (Lefebvre *et al.*, 1997, Dobrinski *et al.*, 1995, Dobrinski *et al.*, 1996, Dobrinski *et al.*, 1997); esto se da mediante un reconocimiento específico de carbohidratos lo que permite la regulación de cambios fisiológicos en el espermatozoide; con el principal objetivo de prolongar la viabilidad y mantener la movilidad espermática con la supresión de la elevación de calcio intracelular (Lefebvre *et al.*, 1997, Dobrinski *et al.*, 1996, Dobrinski *et al.*, 1997); cadenas glicosiladas en la membrana son importantes en el reconocimiento de gametos, adhesión y fertilización en los mamíferos (Jiménez *et al.*, 2003, Desantis *et al.*,

2010, Vázquez *et al.*, 1996), y se sabe que en la superficie espermática hay una gran cantidad de dominios con diferentes funciones, por lo que entenderlos y conocerlos es la llave para comprender las funciones del complejo biológico del espermatozoide durante su existencia fuera del testículo (Desantis *et al.*, 2010).

Gracias a la afinidad de las lectinas por unirse a residuos de azúcar de glucoconjugados, se tienen la oportunidad de poder identificar la distribución y alteración de carbohidratos específicos en la membrana espermática (Desantis *et al.*, 2010, Vázquez *et al.*, 1996). La distribución de carbohidratos y estructuras proteicas podría estar afectado según el estado de capacitación (Jiménez *et al.*, 2003, Lefebvre *et al.*, 1997, Vázquez *et al.*, 1996, Landim-Alvarenga *et al.*, 2004) y reacción acrosomal del espermatozoide (Jiménez *et al.*, 2003); investigaciones han mostrado que al mantener al espermatozoide incubado en condiciones capacitantes provoca la pérdida de su habilidad de unirse al epitelio del oviducto (Lefebvre *et al.*, 1997), esto es consecuencia de daño en la membrana, probablemente por daño en sus receptores o agregación incompleta de los mismos (Bailey *et al.*, 2000), y como ya se ha dicho, esta unión es importante para mantener la viabilidad, movilidad y estado de capacitación espermática al momento de inseminar (Dobrinski *et al.*, 1997).

5.3.1 Manosa y Galactosa

La lectina *Pisum Sativum* aglutinina PSA, es específica a residuos de manosa y galactosa y se ha usado para valorar la integridad acrosomal en muchas especies incluido el equino (Dobrinski *et al.*, 1995, Dobrinski *et al.*, 1996, Salazar *et al.*, 2011, Vázquez *et al.*, 1996, Kaul *et al.*, 2001), por ser considerado un método de marcaje fácil (Kaul *et al.*, 2001). Oligosacáridos como la galactosa se han encontrado de forma muy marcada en el acrosoma y n-acetilgalactosamina de forma débil en la cabeza y la cola con ausencia total en la zona ecuatorial (Desantis *et al.*, 2010), mientras que residuos de fucosa han sido observados en la región postacrosomal (Jiménez *et al.*, 2003), con ausencia en el cinturón ecuatorial (Desantis *et al.*, 2010).

En caballos se ha visto que la unión al epitelio oviductal puede ser inhibida *in vitro* con fetuina, asialofetuina (en donde su grupo carbohidrato termina en galactosa) y galactosa, indicando que la galactosa forma parte integral en la unión al sitio (Lefebvre *et al.*, 1997). Después del proceso de criopreservación se deteriora la capacidad del espermatozoide equino de unirse al epitelio del oviducto y a la zona pelúcida, lo primero puede llevar a un menor número de espermatozoides disponibles reservados en el tracto femenino (Dobrinski *et al.*, 1995), y lo segundo a incapacidad de fecundar; además, se ha observado que la unión de espermatozoides equinos a epitelio oviductal *in vitro* mantienen la concentración intracelular de Ca^{2+} en niveles basales (Dobrinski *et al.*, 1997)

La distribución de sitios de unión a lectinas está restringida a ciertas áreas del espermatozoide. Residuos de glucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina han sido encontrados en la cabeza espermática, acrosoma y región ecuatorial (Jiménez *et al.*, 2003), manosa se ha identificado utilizando lectina Con-A de forma moderada en el acrosoma con débil marcaje en región post-acrosomal y a penas visible en la cola (Desantis *et al.*, 2010).

Sin embargo, existe controversia sobre el patrón de fluorescencia y su significado, mientras que algunos autores reportan la fluorescencia por FITC-PSA como una tinción negativa donde se puede ver un patrón brillante en la región acrosomal cuando el acrosoma espermático se encuentra intacto y ausencia de ésta cuando la reacción acrosomal ha tenido lugar en diferentes especies como el búfalo (Kaul *et al.*, 2001), cerdo (Mattioli *et al.*, 1996), humano (Cardona-Maya y Cadavid, 2005, Cardona *et al.*, 2006) y en equinos (Casey *et al.*, 1993, Salazar *et al.*, 2011, Dobrinski *et al.*, 1995), otros autores reportan lo contrario, afirmando que la presencia de fluorescencia en la región acrosomal significa que este suceso ya ha pasado (Cox *et al.*, 1998, Farlin *et al.*, 1992).

Estudios previos han mostrado que manosa se encuentra preferentemente en la membrana interna del acrosoma del espermatozoide de diferentes mamíferos. En humanos se ha visto que se encuentra en la región anterior del acrosoma pero al inducir reacción acrosomal los sitios de unión cambian a la región ecuatorial y membrana interna del acrosoma (Jiménez *et al.*, 2003) y su función es la de estabilizar la unión espermatozoide-zona pelúcida humana (Desantis *et al.*, 2010)

En cerdos usando lectina Con-A, se observa fluorescencia en toda la cabeza y pieza media en semen fresco y después del proceso de capacitación solo se observa en región acrosomal y en espermatozoides con reacción acrosomal se puede ver una concentración de fluorescencia solo en el borde de la región acrosomal (Jiménez *et al.*, 2003), aunque en cerdos se ha visto negatividad a esta lectina, adquiriendo positividad después de que los espermatozoides son diluidos (Vázquez *et al.*, 1996).

Nuestros resultados nos indican que la falta de fluorescencia es indicativo de que la reacción acrosomal ha sucedido, esto debido a que antes del proceso de congelación el patrón T con CTC, que indica espermatozoides intactos sin reacción acrosomal es mayor que después de descongelar y los patrones encontrados con fluorescencia en acrosoma con PSA (Acro, AcroSC, SCin, T) son mayores antes de congelar y descienden significativamente después de este proceso, aumentando la falta de fluorescencia en esta estructura (SF, Post, Cin).

Aunque pareciera que, no hay una relación entre la presencia de espermatozoides intactos encontrados con CTC y la presencia de patrones de fluorescencia en acrosoma con PSA pues cuando los primeros son mayores a las 2 y 48 horas *post-mortem*, con PSA es en los momentos que menor frecuencia de fluorescencia en acrosoma se puede apreciar, esto

podría deberse a que estamos hablando de espermatozoides intactos que no han sufrido aún de un proceso de capacitación por lo que los receptores a manosa y galactosa intracelulares, podrían no haber salido a la membrana plasmática externa aún, gracias a la movilización de colesterol que se da durante la capacitación (Cardona-Maya y Cadavid, 2005).

En algunos reportes no se describen diferencias significativas en el porcentaje de acrosomas intactos antes y después del proceso de criopreservación en espermatozoides eyaculados utilizando la lectina *Peanut agglutinin* (PNA-FITC) (Clulow *et al.*, 2008), nosotros sin embargo, podemos decir por los patrones encontrados con CTC y PSA que si hay diferencias en la integridad del acrosoma aunque no en el tratamiento de 48 horas *post-mortem*.

Se ha reportado que solo el 62% de los espermatozoides congelados de eyaculado equino tienen integridad membranal y acrosoma intacto (Dobrinski *et al.*, 1995). Nosotros encontramos porcentajes más bajos que esos de espermatozoides intactos, parecidos a los reportados por Olaciregui *et al.* (2014) en espermatozoides epididimarios congelados.

Usando CTC en semen de caballo se ha visto que el mayor aumento de reacción acrosomal se ve durante el congelamiento y no en los procesos de dilución ni refrigeración (Schembri *et al.*, 2002). En semen de carnero se ha visto que la presencia de espermatozoides con reacción acrosomal es mayor, cuando el tiempo en refrigeración aumenta de 16 a 24 horas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008), en el presente trabajo se observa un aumento a las 48 horas, pero a las 72 horas el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal, es menor en fresco, después de congelar no se observa diferencias entre los tratamientos, por lo que el tiempo de refrigeración no influyó en mantener la integridad acrosomal de estos espermatozoides.

5.3.2 Ácido siálico y N-acetilglucosamina

La lectina *Triticum vulgaris* aglutinina (WGA) es específica a residuos de ácido siálico y N-acetilglucosamina. Se ha visto que WGA se une a la zona de la cabeza, acrosoma y pieza media y principal aún después de la capacitación en espermatozoides de cerdo y después de reacción acrosomal ésta fluorescencia en la cabeza disminuye y se pierde en la cola (Jiménez *et al.*, 2003), aunque la mayor fluorescencia siempre está en la zona acrosomal (Vázquez *et al.*, 1996). En equinos se ha ubicado en la región acrosomal de forma moderada sin mostrar presencia en el cinturón ecuatorial (Desantis *et al.*, 2010). Nosotros pudimos observar que efectivamente se encuentra en mayor presencia en el acrosoma y a diferencia de lo reportado si hubo presencia de fluorescencia en el cinturón ecuatorial y siempre hubo fluorescencia en la cola

Oligosacáridos con terminaciones en ácido siálico se ha identificado de forma débil en el acrosoma y de forma moderada en el resto de la cabeza (Desantis *et al.*, 2010). La presencia de este oligosacárido puede actuar como una máscara de grupos antígeno para incrementar la inmunidad del espermatozoide a ser fagocitado por leucocitos (Desantis *et al.*, 2010)

Una gran cantidad de residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico en la membrana plasmática del espermatozoide es indicativo de que el estado de capacitación aún no sucede (Jiménez *et al.*, 2003, Desantis *et al.*, 2010). Nuestros resultados nos muestra que los patrones de fluorescencia en acrosoma (Acro, AptC, Scin), se encuentran en mayor frecuencia antes del proceso de congelación y al descongelar disminuyen significativamente en el grupo cuyos espermatozoides fueron obtenidos a las 72 y 96 horas *post-mortem*, con un aumento en el patrón de fluorescencia en región postacrosomal, con diferencias entre los grupos, pareciera que en fresco el refrigerar por 78 horas mantiene la presencia de N-acetilglucosamina y ácido siálico y el congelar crea un efecto contrario. Adicional a esto, llama la atención que mientras con la lectina PSA la fluorescencia en acrosoma disminuye drásticamente después de congelar a valores por abajo del 10%, con FITC-WGA la frecuencia está por arriba del 38%.

La presencia de estos carbohidratos, sugiere que el glicocáliz del acrosoma del caballo contiene sialigoligosacáridos con terminaciones de Neu5Ac α 2,4GlcNAc y glicanos con terminaciones α Man y GlcNAc (Desantis *et al.*, 2010), demostrando que en el acrosoma del espermatozoide equino existen oligosacáridos con unión N-glicosídico, lo que contribuye a las propiedades fisicoquímicas del glicocáliz dándole su extraordinaria flexibilidad y microheterogeneidad (Desantis *et al.*, 2010).

Esto es importante pues la interacción mediada por carbohidratos puede estar potencialmente afectada por glicosiltransferasas o glucosidasas presentes en el oviducto (Lefebvre *et al.*, 1997), en el cerdo y en el caballo no se han visto diferencias en la región de preferencia de unión (istmo o ampulla) en experimentos en fresco, sin embargo si se han visto cuando son incubado cerca de 24 horas (Lefebvre *et al.*, 1997).

Tomando en cuenta los patrones que se ven con el uso de lectinas en la cabeza espermática se puede inferir que la cabeza del espermatozoide equino está conformada por varias regiones que consisten en diferentes dominios caracterizados por patrones de glicanos específicos posiblemente relacionados con la especialización del glicocáliz durante la fertilización, que es una secuencia de pasos (Desantis *et al.*, 2010)

En algunos estudios se ha sugerido que en la zona ecuatorial intervienen diferentes glicoproteínas que las que se encuentran en el resto de la cabeza del espermatozoide equino, sin embargo, en el presente trabajo, si se encontraron patrones de fluorescencia que indicaron la presencia de los mismos carbohidratos en la región ecuatorial, más es importante recalcar

que dicho estudio fue hecho en espermatozoides de eyaculado en fresco y nuestro estudio fue realizado en espermatozoides epididimarios, además se encontró mayor frecuencia de fluorescencia en cinturón ecuatorial a las 72 horas *post-mortem* en fresco. Se tiene evidencia de que la zona ecuatorial de los mamíferos expresa antígenos de superficie y canales iónicos característicos de esta zona, y tiene importancia por ser el dominio involucrado en la fusión con la membrana del óvulo (Desantis *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Se concluye que el tiempo de almacenamiento *post-mortem* modifica la presencia y distribución de carbohidratos membranales y Ca^{2+} en los espermatozoides equinos obtenidos de epidídimo tanto en fresco como después del proceso de criopreservación.

Hay una evidente pérdida de sitios de unión a calcio en la cabeza espermática a mayor tiempo de conservación en refrigeración y después del proceso de criopreservación

La refrigeración de testículos a 4-5 °C permite la conservación y obtención de espermatozoides epididimarios por un periodo de hasta 72 horas, tiempo suficiente para transportar el material biológico a un centro reproductivo donde se puedan recuperar y criopreservar sin la pérdida potencial de fertilidad aunque se reduce el porcentaje de movilidad en más del 50%.

Si se piensa realizar inseminación artificial se debe refrigerar por 24 o 72 horas, si la inseminación se pretende realizar a las 48 horas, se debe congelar.

Los grandes beneficios que nos puede aportar la criopreservación de gametos nos obliga a que esta biotecnología sea perfeccionada en equinos, buscando hacer más eficiente las técnicas y metodologías de criopreservación, por lo que se requiere más investigación que permita evaluar de forma integral el efecto que la criopreservación tienen en los espermatozoides como saber el daño en la cromatina y la capacidad fertilizante.

Esta técnica puede ser una gran herramienta para preservar y evitar la pérdida de material genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberio, R., Rebuffi, G., Aller, J. & Cancino, A. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de zootecnia*, 52, 15-23.
- Alvarenga, M., Papa, F., Landim-Alvarenga, F. & Medeiros, A. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, 89, 105-113.
- Amann, R. P. 2005a. Functional anatomy of the adult male. In: McKinnon, A. O. & Voss, J. L. (eds.) *Equine Reproduction*. USA: Blackwell Publishing.
- Amann, R. P. 2005b. Physiology and endocrinology. In: McKinnon, A. O. & Voss, J. L. (eds.) *Equine Reproduction*. USA: Blackwell Publishing.
- Arenas, E. R., Cambrón, A. R., Ambriz, D. G., Zúñiga, P. J. P. R., Rodríguez, A. T. & Rosado, A. G. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS*, 78, 5-11.
- Arita, H. T. 2010. El regreso del caballo: lo macro y lo micro en la evolución. *Ciencias*, 46-55.
- Armas, R., Fernández, A., Vásquez, C. & Santiani, A. 2011. Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22, 199-205.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. & Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, 21, 1-7.
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V. & Torner, H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 65, 75-88.
- Boeta, A. M. 2008. Equinos. In: Galina Hidalgo, C. & Valencia, J. (eds.) *Reproducción de animales domésticos*. 3ª ed. México: Limusa.
- Brass, K. 2001. Inseminación artificial en la especie equina. In: Palma, G. A. (ed.) *Biología de la reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Bruemmer, J., Reger, H., Zibinski, G. & Squires, E. 2002a. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 58, 405-407.
- Bruemmer, J., Reger, H., Zibinski, G. & Squires, E. 2002b. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 58, 405-407.
- Cano, T. R. & Felipe, P. Y. E. 2013. *Manual de prácticas de laboratorio de reproducción aplicada*, México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Cardona, W. D. M., Olivera, M. A. & Cadavid, Á. P. 2006. Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 59, 501-510.
- Cardona-Maya, W. & Cadavid, A. 2005. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 29, 676-684.

- Cary, J., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J., Duoos, L. & Fahning, M. 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, 45, 35-41.
- Casey, P. J., Hillman, R. B., Robertson, K. R., Yudin, A. I., Liu, I. K. M. & Drobnis, E. Z. 1993. Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm that Differentiates between Living and Dead Sperm. *Journal of andrology*, 14, 269-297.
- Chamberland, A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M., Sullivan, R. & Bailey, J. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, 55, 823-835.
- Clulow, J., Mansfield, L., Morris, L., Evans, G. & Maxwell, W. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal reproduction science*, 108, 298-308.
- Cox, J., Fernández, P., Saravia, F. & Santa María, A. 1998. Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 30, 93-99.
- Deraga, D. 2007. El caballo y el deporte. In: CUCSH-UdeG (ed.) *Ensayos sobre deportes. Perspectivas sociales e históricas*. Guadalajara, México.
- Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., Nicassio, M., Valentini, L., Di Summa, A. & Lacalandra, G. 2010. Lectin-binding sites on ejaculated stallion sperm during breeding and non-breeding periods. *Theriogenology*, 73, 1146-1153.
- Dobrinski, I., Smith, T. T., Suarez, S. S. & Ball, B. A. 1997. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biology of reproduction*, 56, 861-869.
- Dobrinski, I., Suarez, S. S. & Ball, B. A. 1996. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of reproduction*, 54, 783-788.
- Dobrinski, I., Thomas, P. G. A. & Ball, B. A. 1995. Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae In Vitro. *Journal of andrology*, 16, 536-542.
- Dosh, K. 2013. The cost of owning a Kentucky Derby. *ESPN* [Online]. [Accessed 2/7/15].
- Durán, R. F. 2011. Reseña histórica del caballo. In: Editores, G. L. (ed.) *El Manual del Caballo*.
- Evans, W., Borton, A., Hintz, H. & Dale Van Vleck, L. 1990. *The horse*, New York, NY, Freeman.
- FAO 1995. Determinación de la edad de los caballos. In: Alimentación, O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. (ed.) *Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria*. Roma: Food & Agriculture Org.
- FAO 2010a. *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*, Roma, Food & Agriculture Org.
- FAO, O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. A. 2010b. *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*, Roma.
- Farlin, M., Jasko, D., Graham, J. & Squires, E. 1992. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 32, 23-27.
- Fayrer-Hosken, R., Abreu-Barbosa, C., Heusner, G. & Jones, L. 2008. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 672-676.

- Financiera Rural 2012. Monografía del Ganado Equino. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial.
- Flesch, F. M. & Gadella, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469, 197-235.
- Fraustro, M. R. 1989 *El caballo. Tratado general*, Buenos Aires, Argentina.
- Gadella, B., Rath, R., Brouwers, J., Stout, T. & Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal reproduction science*, 68, 249-265.
- García, V. A. 2012. *¿Qué necesito para importar o exportar semen canino?* [Online]. Federación Canófila Mexicana AC. Available: <http://www.fcm.mx/clinica/investigacion/importacion-semen.html>.
- Ghitescu, L. & Robert, M. 2002. Diversity in unity: the biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds. *Microscopy research and technique*, 57, 381-389.
- Gil, A. M. V., Cardona-Maya, D. W. & Cadavid, Á. P. J. 2007. Muerte embrionaria temprana:¿ Tiene influencia el factor masculino? *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 60, 1057-1068.
- Gil Villa, A. M., Cardona-Maya, W. D. & Cadavid Jaramillo, Á. P. 2007. Muerte embrionaria temprana:¿ Tiene influencia el factor masculino? *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 60, 1057-1068.
- Gonzales, M. H. M., Rodríguez, C., Oropeza, A., Wong, Y. S., Llanos, J. & Gonzales, F. H. 2015. Uso de Plasma Seminal en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Equinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26, 351-356.
- Goolsby, H. A., Elanton, J. R. & Prien, S. D. 2004. Preliminary comparisons of a unique freezing technology to traditional cryopreservation methodology of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24, 314-318.
- Heise, A., Thompson, P. N. & Gerber, D. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*, 123, 192-201.
- Hernández, P. & Fernández, R. 1999. Reproducción de siete especies domésticas. *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, Distrito Federal, México*, 191-194.
- Hernández, P., Fernández, R., Rodríguez, S., Soto, M., Verona, J. & García, R. 2012. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim*, 34, 84-88.
- Hewitt, D., Leahy, R., Sheldon, I. & England, G. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67, 101-111.
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K. & Sieme, H. 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified "good" or "poor" for freezing. *Animal reproduction science*, 125, 112-118.
- James, A., Green, H., Hoffman, S., Landry, A., Paccamonti, D. & Godke, R. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, 58, 401-404.
- Jasko, D., Lein, D. & Foote, R. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197, 389-394.

- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R. o., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M. & Fierro, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1171-1180.
- Johnson, L., Blanchard, T., Varner, D. & Scrutchfield, W. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, 48, 1199-1216.
- Johnson, L., Varner, D., Roberts, M., Smith, T., Keillor, G. & Scrutchfield, W. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*, 60, 471-480.
- Kareskoski, M. & Katila, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal reproduction science*, 107, 249-256.
- Kaul, G., Sharma, G., Singh, B. & Gandhi, K. 2001. Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and Pisum sativum agglutinin fluorescence assay. *Theriogenology*, 55, 1457-1468.
- Kholkute, S., Meherji, P. & Puri, C. 1992. Capacitation and the acrosome reaction in sperm from men with various semen profiles monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *International journal of andrology*, 15, 43-53.
- Kruuv, J., Glofcheski, D. & Lepock, J. 1990. Interactions between cryoprotectors and cryosensitizers. *Cryobiology*, 27, 232-246.
- Landim-Alvarenga, F., Graham, J., Alvarenga, M. & Squires, E. 2004. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during in vitro capacitation. *Anim Reprod*, 1, 96-105.
- Lefebvre, R., Lo, M. C. & Suarez, S. S. 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biology of Reproduction*, 56, 1198-1204.
- Levy, L. d. I. V. C. & Rodríguez, M. A. 1993. Función zootécnica, desde la antigüedad a nuestros días. In: Trillas (ed.) *Temas selectos de zootecnia equina*. México.
- Lucio, R. A., Tlachi, J. L., López, A. A., Zempoalteca, R. & Velázquez-Moctezuma, J. 2009. Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 40, 405-415.
- Lucio, R. A., Tlachi-López, J. L., Eguibar, J. R. & Ágmo, A. 2013. Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiology & behavior*, 110, 73-79.
- Macias, G. B., Ortega, F. C., Aparicio, I., Miró-Morán, A., Morillo, R. A., Gallardo, B. J., Gonzalez, F. L., Balao, d. S. C., Rodríguez, M. H. & Tapia, J. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*, 77, 1280-1289.
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraez, P., de Paz, P. & Anel, L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65, 471-485.
- Mattioli, M., Barboni, B., Lucidi, P. & Seren, E. 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 45, 373-381.
- Medeiros, A., Gomes, G., Carmo, M., Papa, F. & Alvarenga, M. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 273-276.

- Merino, R., Luna, A., Morales, M., Saldívar, R. & Vidal, G. 2004. Respuesta acrosomal de espermatozoides humanos demostrada con clorotetraciclina. *Ginecología y Obstetricia de México*, 72, 239-246.
- Moein-Vaziri, N., Phillips, I., Smith, S., Almiñana, C., Maside, C., Gil, M. A., Roca, J., Martinez, E. A., Holt, W. V. & Pockley, A. G. 2014. Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction*, 147, 719-732.
- Monteiro, G., Guasti, P., Hartwig, F., Dellaqua Jr, J., Alvarenga, M. & Papa, F. 2013. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 681-686.
- Monteiro, G., Papa, F. O., Zahn, F., Dellaqua, J., Melo, C., Maziero, R., Avanzi, B., Alvarenga, M. & Guasti, P. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*, 127, 197-201.
- Morel, M. C. D. 2008. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*, CABI.
- Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Finol-Parra, G., Carruyo, G., Vilchez-Siu, V., Osorio-Meléndez, C., Rubio-Guillén, J. & Valeris-Chacín, R. 2011. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24, 116-122.
- Neild, D., Gadella, B., Agüero, A., Stout, T. & Colenbrander, B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal reproduction science*, 89, 47-56.
- Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. a. G., Miragaya, M. H., Colenbrander, B. & Agüero, A. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59, 1693-1705.
- Olaciregui, M., Gil, L., Monton, A., Luno, V., Jerez, R. & Marti, J. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*, 68, 91-95.
- Oliveira, C., Vasconcelos, A., Souza, F., Martins-Filho, O., Silva, M., Varago, F. & Lagares, M. 2010. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal reproduction science*, 118, 194-200.
- Palomar, C. 2014. El papel de la charrería como fenómeno cultural en la construcción del Occidente de México. *Revista Europea de Estudios Latinoamericanos y del Caribe*, 76, 83-98.
- Papa, F. O., Melo, C., Fioratti, E., Dell'Aqua, J., Zahn, F. & Alvarenga, M. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science*, 107, 293-301.
- Páramo, R. M. R. 2008. Morfofisiología de los órganos genitales del macho y de la hembra. In: Galina, C. & Valencia, J. (eds.) *Reproducción de Animales Domésticos*. 3ª ed. México: Limusa.
- Perez-Osorio, J., Mello, F., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L. & Henry, M. 2008. Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Anim. Reprod.*, 3, 5.
- Perry, R., Naeeni, M., Barratt, C., Warren, M. & Cooke, I. 1995. A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification. *Fertility and sterility*, 64, 150-159.

- Pillet, E., Labbee, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumalh, V., Antonh, M., Deshercesi, S., Schmitti, E. & Magistrini, M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77, 268-279.
- Pineda, M. 2014. Carreras de caballos, ¿dinero rápido? *Alto Nivel*.
- Pojprasath, T., Lohachit, C., Techakumphu, M., Stout, T. & Tharasanit, T. 2011. Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology*, 75, 1742-1749.
- Pukazhenth, B. S., Johnson, A., Guthrie, H. D., Songsasen, N., Padilla, L. R., Wolfe, B. A., da Silva, M. C., Alvarenga, M. A. & Wildt, D. E. 2014. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology*, 68, 205-214.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M. & Gadella, B. M. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction*, 65, 462-470.
- Rodríguez-Almeida, F. A., Ávila Cota, C. O., Anchondo Garay, A., Sánchez-Ramírez, B. & Jiménez Castro, J. A. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, 42, 399-406.
- SAGARPA & Senasica 2011. Procedimientos para la importación, exportación y movilización nacional de equinos, que participarán en los juegos panamericanos Guadalajara 2011, así como para la importación de alimentos, suplementos alimenticios y medicamentos. *In: Delegaciones Estatales en el Distrito Federa, E. d. M. y. J. (ed.) México*.
- Salazar, J., Teague, S., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T. & Varner, D. 2011. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76, 409-418.
- Schembri, M., Major, D., Maxwell, W., Suttie, J. & Evans, G. 2002. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reproduction, Fertility and Development*, 14, 225-233.
- Senger, P. L. 2003a. Endocrinology of the Male and Spermatogenesis. *In: Senger, P. L. (ed.) Pathways to pregnancy and parturition*. 2^a ed. USA: Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Senger, P. L. 2003b. The organization and function of the male reproductive system. *In: Senger, P. L. (ed.) Pathways to pregnancy and parturition*. 2^a ed. USA: Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Senger, P. L. 2003c. Puberty. *In: Senger, P. L. (ed.) Pathways to pregnancy and parturition*. 2^a ed. USA: Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Senger, P. L. 2003d. Reproductive Cyclicality - Terminology and Basic Concepts. *In: Senger, P. L. (ed.) Pathways to pregnancy and parturition*. 2^a ed. USA: Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Sinowatz, F. & Friess, A. 1983. Localization of lectin receptors on bovine epididymal spermatozoa using a colloidal gold technique. *Histochemistry*, 79, 335-344.
- Squires, E., Keith, S. & Graham, J. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 1056-1065.
- Tartaglione, C., Puente, M. & Ritta, M. 2009. Espermatozoides epididimarios bovinos: características y habilidad de respuesta in vitro al inductor de reacción acrosomal GABA (ácido gama-aminobutírico). *Revista Argentina de Producción Animal*, 29, 29-55.

- Thiffault, M. & Lewis, J. 1974. *Western horse and horseman's digest*, Chicago, Follett Pub. Co.
- Toro, M. 2009. Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15, 145-169.
- Toscano, I., Olivo, I., Núñez, R., Cajero, M., Val, D. & Conejo, J. 2014. Test de congelación de semen de burro criollo (*Equus Asinus*). *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, 4, 94-96.
- USDA 2012. Movimiento Internacional de Caballos. In: APHIS (ed.) *Programa Nacional de acreditación veterinaria*.
- Vázquez, J. M., Martínez, E., Pastor, L. M., Roca, J., Matas, C. & Calvo, A. 1996. Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta histochemica*, 98, 93-100.
- Wilhelm, K., Graham, J. & Squires, E. 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 46, 559-578.
- Wrench, N., Pinto, C., Klinefelter, G., Dix, D., Flowers, W. & Farin, C. 2010. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal reproduction science*, 119, 219-227.

1 **Efecto de la criopreservación en espermatozoides epididimarios**
2 **equinos sobre la actividad de Ca²⁺ a diferentes tiempos *postmortem*.**

3
4 Liz Dahani González-Mendiola¹, Jorge Antonio González Santos², José Antonio Herrera
5 Barragán², Alejandro Ávalos Rodríguez².

6
7 ¹*Estudiante de Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-*
8 *Xochimilco, CDMX, México,* ²*Laboratorio de Bioquímica de la reproducción, Universidad*
9 *Autónoma Metropolitana-Xochimilco, CDMX, México.*

10 Correspondencia debe ser enviada a A Ávalos; Email: avalosr@correo.xoc.uam.mx

11
12 **Resumen.** Se ha utilizado el biomarcador fluorescente Clortetraciclina (CTC) con el
13 **objetivo de evaluar el efecto que tiene el proceso de criopreservación sobre la actividad**
14 **de Ca²⁺ en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo equino a diferentes**
15 **tiempos *postmortem* (2, 24, 48, 72 y 96 horas). Todas las variables espermáticas básicas**
16 **mostraron un patrón descendente a través de las horas en fresco y después del proceso**
17 **de criopreservación. Se encontraron cuatro patrones de fluorescencia antes descritos en**
18 **equinos, y que se pueden asociar con si el espermatozoide esta o no capacitado y si**
19 **presenta reacción acrosomal. Se puede observar que hay un aumento en el número de**
20 **células que presentan patrones compatibles con espermatozoide capacitado a mayor**
21 **sea el tiempo posrmortem con un importante descenso a las 24 horas y estos se**
22 **incrementan hasta en un 50% después del proceso de criopreservación, siendo mayor**
23 **en patrones compatibles con estado de reacción acrosomal y un efecto inverso se**
24 **aprecia en patrones compatibles con espermatozoides intactos no capacitados después**
25 **del proceso de criopreservación. Nuestro trabajo no solo describe una los patrones de**
26 **fluorescencia con CTC en espermatozoides epididimarios equinos también nos permite**
27 **seleccionar la ventana de oportunidad que se tiene en animales castrados o muertos**
28 **prematuramente, y así lograr mayor eficiencia en técnicas de reproducción asistida.**

29
30 **Introducción**

31 El equino ha sido utilizado desde tiempos ancestrales como alimento, medio de carga,
32 transporte y para el manejo de ganado, pero sobre todo para deporte y entretenimiento,
33 volviéndolo un animal de élite. A pesar de estas demandas, en equinos no se cuenta con
34 estrategias estandarizadas de reproducción para mejorar su producción y reproducción
35 (Financiera Rural, 2012), y aunque la criopreservación de semen es una estrategia eficiente
36 para la preservación del germoplasma, en equinos es una novedad reciente y a pesar de la
37 gran diversidad genética que existe en los equinos, solo hay pocos bancos de germoplasma
38 en el mundo (Pojprasath *et al.*, 2011).

39 Por otro lado también se ha tenido renuencia a la criopreservación de semen equino no sólo
40 por los costos, si no, también por dificultades en la recolección de semen, bajos porcentajes
41 de viabilidad espermática post-descongelación y variabilidad en los rangos de gestaciones
42 (Pojprasath *et al.*, 2011, Olaciregui *et al.*, 2014). Sin embargo, la pérdida de material
43 genético debido a muerte repentina por diferentes causas (natural o accidental) o incluso la
44 castración de caballos debido a su fin zootécnico, son causas que justifican la recuperación y
45 conservación de espermatozoides epididimarios en éstas circunstancias y presenta una
46 alternativa para la conservación de germoplasma (Tartaglione *et al.*, 2009, Hernández *et al.*,
47 2012, Papa *et al.*, 2008, Monteiro *et al.*, 2011).

48 La obtención de espermatozoides del epidídimo ha mostrado ser un recurso accesible para
49 éste objetivo pues en él se encuentra una cantidad significativa de células viables que pueden
50 ser utilizadas para fertilización, además, gestaciones exitosas se han reportado en varias
51 especies además del equino usando espermatozoides epididimales criopreservados
52 (Bruemmer *et al.*, 2002b). Pero también es conocido que el proceso de criopreservación
53 provoca daños irreversibles en los espermatozoides equinos y no más del 50% sobrevive a
54 éste proceso o su capacidad fertilizante disminuye (Pojprasath *et al.*, 2011, Monteiro *et al.*,
55 2011, Papa *et al.*, 2008).

56 En México, el uso de biotecnologías se limita a resguardar semen de bovinos, ovinos y
57 caprinos con alto valor productivo y genético, pero en equinos solo es utilizada para
58 explotaciones universitarias y gubernamentales (FAO, 2010b, Toscano *et al.*, 2014).

59 Por lo que evaluar los efectos de la criopreservación en espermatozoides epididimales
60 equinos a diferentes horas *postmortem*, puede darnos una “ventana de oportunidad” para
61 crear protocolos necesarios para programas de asistencia reproductiva en equinos domésticos
62 y en peligro de extinción.

63

64 **Materiales y método**

65 El biomarcador clortetraciclina (CTC) fue obtenido de Sigma (St Louis, Mo). Los medios se
66 prepararon en nuestro laboratorio.

67

68 **Colección de material biológico y diseño experimental**

69 Se obtuvieron testículos de 33 caballos adultos criollos, con edades de entre 3 a 15 años,
70 calculada por observación de piezas dentarias (FAO, 1995), destinados a sacrificio en un
71 rastro en Río Frío, Estado de México (19°21'09"N 98°40'11"O). Inmediatamente después del
72 sacrificados, se realizó orquidectomía a nivel del plexo pampiniforme y ambos testículos
73 fueron colocados en bolsas de polietileno, con 20 ml de solución salina al 0.9% estéril. La
74 fecha y hora de muerte, colección y refrigeración fueron anotados en cada muestra. Se
75 transportaron al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción en la UAM-Xochimilco en
76 una caja de poliestireno, con refrigerantes manteniendo una temperatura de 4-5°C,
77 monitoreada con un termómetro digital infrarrojo (Microlife® NC 100). Por medio de
78 muestreo aleatorio simple sin reemplazo las muestras fueron asignadas a un tratamiento de
79 refrigeración (2, 24, 48, 72 y 96 horas), las evaluaciones espermáticas se realizaron en dos
80 momentos del diseño, 1) al cumplir su tiempo de refrigeración asignado y posterior a la
81 obtención de espermatozoides, y 2) después del proceso de criopreservación al ser
82 descongelados.

83

84 **Recuperación de espermatozoides epididimales**

85 Al cumplir el tiempo de refrigeración la cola del epidídimo fue separada del testículo, y los
86 espermatozoides se recuperaron por técnica de cortes y flotación (Martinez-Pastor *et al.*,
87 2006); se realizó un pool espermático con ambas colas epididimales utilizando 5 ml de
88 medio EDTA Glucosa (C₆H₁₂O₆ 322.20 mM, EDTA disódico 9.93 mM, Na₃C₆H₅O₇ 12.58
89 mM, NaHCO₃ 14.28 mM, pH 6.5) (Olaciregui *et al.*, 2014, Clulow *et al.*, 2008) y se incubó 1
90 ml de la muestra a 38°C para realizar las evaluaciones.

91

92 **Evaluación de parámetros espermáticos básicos**

93 Para evaluar motilidad total y progresiva se observó bajo un microscopio óptico y un
94 objetivo de 20X una alícuota de 10 µl de muestra, se utilizó un sistema de observación
95 subjetivo, estimando la proporción total de espermatozoides con movilidad total (curvilínea,

96 lenta y sin desplazarse) y la movilidad progresiva equivalente a un movimiento rectilíneo y
97 rápido. La determinación de espermatozoides vivos se realizó con solución eosina-nigrosina
98 (Hernández *et al.*, 2012, Olaciregui *et al.*, 2014), en una dilución 1:1 (v/v) bajo un
99 microscopio de luz en objetivo 40X. La misma tinción fue utilizada para evaluar morfología
100 bajo un microscopio óptico, con aceite de inmersión a 100X (Clulow *et al.*, 2008, Hernández
101 *et al.*, 2012). La concentración espermática se determinó con un hemocitómetro de Neubauer
102 (Lucio *et al.*, 2013).

103

104 **Evaluación de la actividad de calcio**

105 Se utilizó el biomarcador fluorescente clortetraciclina (CTC), dicha solución (750 mM CTC
106 en 322.20 mM C₆H₁₂O₆, 9.93 mM C₁₀H₁₆N₂O₈, 12.58 mM Na₃C₆H₅O₇ y 14.28 mM
107 NaHCO₃) fue preparada y el pH ajustado a 6.5 con NaOH (1N), se incubó a 37°C y protegió
108 de la luz (Merino *et al.*, 2004, Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008). Para el ensayo se colocaron
109 5 µl de la solución de CTC y 5 µl de la muestra en un portaobjetos atemperado y se realizó
110 un frotis, protegiéndolo siempre de la luz. Por cada muestra se evaluaron 100
111 espermatozoides bajo iluminación excitación a 400-440 nm y emisión a 470 nm, utilizando
112 un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 (AccesoLab, México), con cámara
113 digital EvolutionVF Color Cooled y programa Image-Pro® Plus (Media Cybernetics, Inc,
114 Rockville, MD) para la captura de imágenes.

115

116 **Proceso de congelación y descongelación**

117 La muestra fue diluida para ajustar una concentración espermática de 100 x 10⁶ Esp/ml
118 (Hernández *et al.*, 2012, Monteiro *et al.*, 2011) y se adicionó 20% (v/v) de yema de huevo y
119 5% (v/v) de Dimetilformamida (DMF), (Olaciregui *et al.*, 2014), con un tiempo de equilibrio
120 de 30 minutos para su almacenaje en pajillas plásticas de 0.5 ml previamente enfriadas (5
121 °C), para ser congeladas en vapores de nitrógeno (4 cm de distancia de nitrógeno líquido por
122 10 min ~-70 °C/min) y después fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su análisis
123 (Hernández *et al.*, 2012, Olaciregui *et al.*, 2014). A las 4 semanas de congelación, las
124 muestras fueron descongeladas a 37°C en baño maría por 30 segundos y transferidas a tubos
125 plásticos de 1.5 ml incubándolas a 38°C (Monteiro *et al.*, 2011, Papa *et al.*, 2008), para
126 evaluar los parámetros espermáticos básicos, la actividad de calcio y la distribución de
127 carbohidratos membranales.

128

129 **Análisis estadístico**

130 El diseño estadístico fue completamente al azar por lo que se realizó un análisis de varianza
131 ANOVA de una vía, siguiendo el modelo matemático $Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_i$, para los
132 tratamientos y una prueba de Tukey para la diferencia de medias; para las diferencias antes y
133 después del proceso de criopreservación se realizó una prueba t de Student para muestras
134 pareadas, los resultados fueron expresados en medias ± desviación estándar. Los datos se
135 analizaron con el programa estadístico RStudio® Versión 1.0.136 – © 2009-2015 para
136 Macintosh, utilizando un nivel de significancia de 0.05.

137

138 **Resultados**

139 **Parámetros espermáticos básicos**

140 Los resultados de la variable de movilidad total y progresiva en fresco y post-criopreservado
141 mostraron un patrón descendente (Tabla 1 y 2). Se observa un significativo declive (p<0.05)
142 a las 96 horas en refrigeración de la movilidad progresiva; aunque después de criopreservar

143 no se apreciaron motilidades progresivas mayores al 20%, en espermatozoides refrigerados
144 24 horas los resultados fueron >10% (Tabla 2).

145 Por otro lado, la viabilidad espermática encontrada en el presente trabajo también mostró
146 un patrón descendente en los diferentes tiempos de refrigeración (Tabla 1), aunque, la mayor
147 frecuencia fue a las 24 horas *post-mortem*, no se encontraron diferencias significativas en el
148 número de espermatozoides vivos al refrigerar 2, 48, 72 y 96 horas ($p>0.05$).

149 Después del proceso de criopreservación se tuvo una mortalidad espermática mayor del
150 50%, se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre el tiempo de refrigeración 72 y
151 96 horas (Tabla 2), siendo mayor la frecuencia de espermatozoides vivos a las 72 horas
152 postmortem.

153 La morfología normal espermática evaluada no mostró diferencias significativas en los
154 diferentes tratamientos, aunque se encontró una gran frecuencia de gota citoplasmática.

155

156 **Patrones con clortetraciclina**

157 Fueron identificados cuatro patrones de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) en los
158 espermatozoides evaluados: **T**: con fluorescencia uniforme en toda la cabeza; **A**: libre de
159 fluorescencia en la región post acrosomal; **PA**: sin fluorescencia en la región acrosomal; y
160 **SF**: cabeza libre de fluorescencia (Figura 1).

161 La Figura 2-A muestra los valores promedio encontrados de los porcentajes de cada patrón a
162 diferentes horas de refrigeración. El patrón con mayor frecuencia fue el “T”, guardando una
163 relación inversa proporcional con el patrón de fluorescencia “PA” y el “SF”. Además son
164 evidentes las diferencias significativas ($p<0.05$) en los patrones “T” y “SF” donde el primero
165 tienen mayor frecuencia en los grupos de 2 y 48 horas, que el resto de los tratamientos y el
166 patrón “SF” tiene menor porcentaje en estos grupos.

167 Después del proceso de congelación el patrón “T” descendió en los tratamientos de 2, 48 y
168 72 horas *post-mortem* 48.49% en promedio y los otros dos tratamientos aumentaron en
169 104.80% en promedio, estos descensos se dieron en relación con el aumento en los patrones
170 “PA” y “SF”. Con diferencias significativas ($p<0.05$) solo en el patrón “SF” en el
171 tratamiento de 2 horas presentándose en menor frecuencia que el resto (Figura 2-B).

172 La comparación entre el antes y el después de criopreservar mostró en el grupo de 2 horas
173 *post-mortem* diferencias en el patrón T y PA, con un descenso del 52% en el patrón T y un
174 aumento de 800% en el patrón PA, al descongelar, efecto parecido también fue observado en
175 el grupo de 48 horas (descenso del 60% del patrón T e incremento de 65% en PA) y 72 horas
176 (descenso del 42% del patrón T e incremento de 37% en PA) aunque este último sin ser
177 significativo ($p>0.05$) (Figura 7).

178

179 **Discusión**

180

181 Los resultados encontrados en motilidad espermática en éste trabajo se asemejan a lo
182 reportado por James et al. (2002), que tampoco encontró diferencias en la motilidad
183 progresiva al refrigerar 24 o 48 horas a 5°C ($p>0.05$) pero si al hacerlo por 72 y 96 horas. Se
184 ha reportado que la motilidad espermática progresiva es mayor cuando se congela con
185 congelador programable que con caja de poliestireno, inmediatamente después de
186 descongelar ($p<0.05$) y a las 3 horas ($p<0.05$), debido a la disminución de la temperatura a
187 una velocidad mayor que cuando se usa un congelador programable (Clulow *et al.*, 2008), en
188 este estudio se utilizó una caja de poliestireno.

189 En investigaciones o durante los protocolos de inseminación o criopreservación se prefiere
190 que la motilidad progresiva de los espermatozoides sea $\geq 60\%$ (Macias *et al.*, 2012, Blotner

191 *et al.*, 2001), aunque otros autores realizan criopreservación con motilidades $\geq 30\%$
192 (Hernández *et al.*, 2012). Con estas bases encontramos solo una posible ventana de
193 oportunidad en nuestro trabajo tomando en cuenta solo la motilidad progresiva: refrigerar
194 como máximo 2 horas obteniendo motilidades progresivas $>30\%$. El tiempo de refrigeración
195 tiene gran importancia para la conservación de los espermatozoides epididimales y depende
196 de la biotecnología que se decida emplear, si se busca usar inseminación artificial utilizar
197 muestras con $<60\%$ de espermatozoides con motilidad progresiva, disminuiría los
198 porcentajes de gestaciones exitosas (Chamberland *et al.*, 2001, Bruemmer *et al.*, 2002a),
199 más, si se tiene la posibilidad de usar otras técnicas de reproducción asistida como
200 inseminación por laparoscopia o técnicas *in vitro* (Perez-Osorio *et al.*, 2008) el obtener
201 espermatozoides en fresco de tejido refrigerado hasta por 72 horas muestra ser una
202 oportunidad para preservar el material genético de equinos y hasta 24 horas de
203 espermatozoides criopreservados. Sin embargo, el equino se caracteriza por tener una gran
204 variabilidad reproductiva, lo que se demuestra con lo encontrado por diferentes autores
205 donde incluso refrigerar por solo 24 horas muestra porcentajes de espermatozoides con
206 motilidad progresiva de 28.2% (Papa *et al.*, 2008) y después de criopreservación porcentajes
207 por debajo de 30% (Medeiros *et al.*, 2002, Squires *et al.*, 2004), valores por debajo de lo
208 mínimo reportado como requerido, como nosotros encontramos en el presente trabajo,
209 aunque, otros reportes han sido de motilidades progresivas entre 50-60% (Hoffmann *et al.*,
210 2011).

211 Patrones descendentes similares de viabilidad observados en este trabajo se han reportado en
212 otros estudios (James *et al.*, 2002), aunque otros han encontrado porcentajes de
213 espermatozoides vivos menores a los que reportamos ($< 60\%$) en espermatozoides obtenidos
214 de cola de epidídimo equino en fresco (Rathi *et al.*, 2001).

215 Hernández *et al.* (2012) reportan un porcentaje de espermatozoides vivos del 60.9% al
216 descongelar espermatozoides epididimales equinos y criopreservados en fresco, porcentaje
217 mayor del encontrado en el presente trabajo (Tabla 2). Es de esperarse estas bajas en los
218 porcentajes de viabilidad espermática después de criopreservación, pues se sabe que no mas
219 del 50% de los espermatozoides sobreviven a este proceso (Pojprasath *et al.*, 2011,
220 Hernández *et al.*, 2012), debido al choque térmico que involucra la disminución de su
221 temperatura de 5°C a -196°C, pero sobre todo al proceso de descongelación de los
222 espermatozoides, sometiéndose a cambios irreversibles en la membrana espermática
223 (Olaciregui *et al.*, 2014).

224 Los resultados sobre la morfología espermática son contradictorios, algunos autores han
225 observado que espermatozoides de eyaculado muestran mayor porcentaje de malformaciones
226 que los obtenidos de epidídimo (Monteiro *et al.*, 2011), mientras que otros reportan lo
227 contrario (Heise *et al.*, 2011), hay estudios previos que reportan porcentajes de morfología
228 normal en espermatozoides obtenidos de epidídimo por técnica de flotación en menor
229 frecuencia que los encontrados en el presente trabajo (Cary *et al.*, 2004) y otros reportan
230 mayores porcentajes que los que nosotros pudimos observar (Hernández *et al.*, 2012).

231 En lo que si se encuentra concordancia es que, se han reportado diferencias significativas en
232 la morfología normal de espermatozoides de equinos antes y después de congelar (Clulow *et al.*,
233 2008, Hernández *et al.*, 2012, Heise *et al.*, 2011), con porcentajes similares a los que
234 nosotros exponemos aquí (Hernández *et al.*, 2012). La morfología espermática se modifica
235 en criopreservación por haber mayor reactividad de membrana, y aunque está dado por una
236 variabilidad individual, hay que tener en cuenta que cada estructura espermática tiene una
237 susceptibilidad específica a la criopreservación (Blottner *et al.*, 2001), la pieza principal
238 tiende a sufrir enrollamientos frecuentemente al sufrir un choque térmico, con disminución

239 en su movimiento progresivo como consecuencia (Wrench *et al.*, 2010).
240 En este trabajo se lograron identificar cuatro patrones con clortetraciclina antes descritos
241 incluso en humanos (Perry *et al.*, 1995, Merino *et al.*, 2004, Kholkute *et al.*, 1992), equinos
242 (Rathi *et al.*, 2001) y otros mamíferos (Chamberland *et al.*, 2001, Rodríguez-Almeida *et al.*,
243 2008, Bailey *et al.*, 2000). Determinados patrones fluorescentes con CTC se asocian con si el
244 espermatozoide esta en estado de capacitación o si hay o no reacción acrosomal en el
245 espermatozoide (Moein-Vaziri *et al.*, 2014), los patrones PA (fluorescencia brillante en la
246 región postacrosomal) y T (fluorescencia uniforme en cabeza) se han asociado con no
247 capacitación en espermatozoides humanos (Perry *et al.*, 1995); en equinos leve fluorescencia
248 en la cabeza con o sin una banda brillante en la zona ecuatorial se asocia a espermatozoides
249 vivos no capacitados y el encontrar una fluorescencia brillante en la zona acrosomal (patrón
250 A) es equivalente a espermatozoide vivo capacitado sin reacción acrosomal (Neild *et al.*,
251 2003). Un patrón de fluorescencia punteada se ha descrito para representar al espermatozoide
252 con acrosoma parcialmente reaccionado (Perry *et al.*, 1995) y el patrón SF (ausencia de
253 fluorescencia) para espermatozoides con reacción acrosomal (Merino *et al.*, 2004); en
254 equinos estos dos patrones junto con el patrón PA representan espermatozoides con reacción
255 acrosomal sin hacer distinción de un estadio parcial o total (Neild *et al.*, 2003).
256 La clortetraciclina neutra fluorescente pasa a través de la membrana celular, creando
257 complejos con Ca^{2+} libre intracelular y esto conduce a un aumento en su intensidad de
258 fluorescencia. La unión preferencial del complejo CTC- Ca^{2+} a las regiones hidrófobas de la
259 membrana espermática resulta en los diferentes patrones de fluorescencia antes descritos
260 (Moein-Vaziri *et al.*, 2014). Durante el proceso de capacitación fisiológico, se inicia una
261 delicada reorientación y modificación de moléculas en la membrana plasmática, con el fin de
262 permitir que el espermatozoide se una a la zona pelúcida (ZP) del ovocito e inicie una
263 reacción acrosomal, un evento exocitótico que es necesario para que éste penetre la ZP
264 (Gadella *et al.*, 2001, Rathi *et al.*, 2001, Arenas *et al.*, 2010), que es Ca^{2+} dependiente por lo
265 que se requiere el aumento de sus concentraciones internas durante la capacitación para que
266 ésta suceda (Rathi *et al.*, 2001). Cuando los espermatozoides están alterados, los iones Na^+ y
267 Ca^{2+} que entran siempre a las células espermáticas por medio de transporte activo, lo hacen
268 en mayor cantidad. A 5°C la permeabilidad al Ca^{2+} crece significativamente, superando la
269 capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca^{2+} . Así, el Ca^{2+} se
270 acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Brass, 2001).
271 Las ventaja del uso de CTC es que evalúa la etapa final de capacitación independientemente
272 de la reacción acrosomal. Sin embargo, ya que se supone que las fluctuaciones en la
273 distribución de los complejos Ca^{2+} -CTC que se unen a moléculas de fosfolípidos
274 membranales son responsables de los diferentes patrones observados, se debe tener cuidado
275 en la interpretación de los resultados, ya que cualquier factor que afecte el espectro de
276 absorción de fluorescencia de la CTC o los complejos Ca^{2+} -fosfolípido o la intensidad de
277 fluorescencia de estos complejos podría causar una mala interpretación en el potencial del
278 estado de capacitación de los espermatozoides (Moein-Vaziri *et al.*, 2014).
279 La motilidad es un parámetro utilizado como factor pronóstico posterior a la capacitación
280 espermática. El patrón PA que se encontró y sobre todo su frecuencia ascendente se ha
281 relacionado con astenozoopermia (Kholkute *et al.*, 1992, Merino *et al.*, 2004), lo cual
282 concuerda con el porcentaje descendente de motilidad espermática pero no con los valores de
283 frecuencia del patrón PA que se pudo observar en nuestro resultados, sin embargo, es difícil
284 señalar comparaciones por las diferencias de especie principalmente sin mencionar las
285 diferentes formas de manejo.

286 El que haya un espermatozoide intacto es de vital importancia para el uso de biotecnologías
287 de reproducción asistida pues de no ser así los porcentajes de fertilidad disminuyen, debido a
288 que son procesos que se requieren solo en el momento en que los gametos femenino y
289 masculino entren en contacto en métodos como la inseminación artificial (Gadella *et al.*,
290 2001). Hay reportes de espermatozoides epididimales equinos donde solo el $50.2\% \pm 0.8$ se
291 encuentran intactos al ser obtenidos en fresco (Rathi *et al.*, 2001), y a pesar, que el proceso
292 de refrigeración y congelación interrumpen la actividad metabólica espermática y alargan la
293 viabilidad, se puede inducir la capacitación prematura de los espermatozoides, con incluso
294 refrigeración por solo 24 horas (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008) y la criopreservación
295 induce no solo la capacitación, si no también reacción acrosomal, daño membranal y
296 disminución de la motilidad progresiva (Neild *et al.*, 2003), en condiciones experimentales
297 incubando con medios capacitantes esto sucede en tan solo 6 horas, pero no se ha visto
298 relación entre la viabilidad y el estado de capacitación (Moein-Vaziri *et al.*, 2014).
299 Una gran proporción de espermatozoides equinos con cambios en los patrones de
300 capacitación se ha observado después de refrigerar y descongelar usando CTC (Neild *et al.*,
301 2003), y aunque se han descrito de 3 (Rathi *et al.*, 2001) a 6 patrones de fluorescencia en
302 caballos (Neild *et al.*, 2003), los resultados son similares a lo obtenido en este trabajo donde
303 se aprecia un aumento en los porcentajes de patrones compatibles con estado de capacitación
304 y reacción acrosomal a mayor horas *postmortem*, con diferencias significativas en las horas
305 de refrigeración y antes y después de congelar.
306 En conclusión las horas *postmortem* favorecen la capacitación espermática demostrada por el
307 incremento de los patrones fluorescentes compatibles con dicho estado, este proceso varía a
308 través del tiempo. La criopreservación tiene efectos en espermatozoides epididimarios equinos
309 a 2, 24, 48, 72 y 96 horas *postmortem*, induciendo procesos como la capacitación y reacción
310 acrosomal prematuras. Sí no es posible coleccionar espermatozoides epididimales inmediatamente
311 después de la muerte del caballo, es posible preservar el epidídimo a 5°C y procesar las
312 muestras en las primeras 48 h después de la muerte del animal y realizar criopreservación.
313 Estos hallazgos nos podrían permitir seleccionar la ventana de oportunidad que se tiene en
314 animales castrados o muertos prematuramente, y así lograr mayor eficiencia en técnicas de
315 reproducción asistida.

316 **Referencias**

- 317 **Arenas ER, Cambrón AR, Ambriz DG, Zúñiga PJPR, Rodríguez AT & Rosado**
318 **AG** 2010 Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del
319 espermatozoide. *ContactoS* **78** 5-11.
- 320 **Bailey JL, Bilodeau J & Cormier N** 2000 Semen cryopreservation in domestic
321 animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology* **21** 1-7.
- 322 **Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V & Torner H** 2001
323 Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation
324 during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science* **65** 75-88.
- 325 **Brass K** 2001. Inseminación artificial en la especie equina. In *Biotecnología de la*
326 *reproducción*, pp. 525-562.
- 327 **Bruemmer J, Reger H, Zibinski G & Squires E** 2002a Effect of storage at 5°C on
328 the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa.
329 *Theriogenology* **58** 405-407.

330 **Bruemmer J, Reger H, Zibinski G & Squires E** 2002b Effect of storage at 5°C on
331 the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa.
332 *Theriogenology* **58** 405-407.

333 **Cary J, Madill S, Farnsworth K, Hayna J, Duoos L & Fahning M** 2004 A
334 comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in
335 stallions. *The Canadian Veterinary Journal* **45** 35-41.

336 **Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard M, Sullivan R & Bailey J** 2001
337 The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during
338 bovine sperm capacitation. *Theriogenology* **55** 823-835.

339 **Clulow J, Mansfield L, Morris L, Evans G & Maxwell W** 2008 A comparison
340 between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal*
341 *Reproduction Science* **108** 298-308.

342 **FAO 1995**. Determinación de la edad de los caballos. In *Manual para el personal*
343 *auxiliar de sanidad animal primaria*, pp. 114-117.

344 **FAO OdINUpIAYIA** 2010 *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para*
345 *la alimentación y la agricultura*. Roma.

346 **Financiera Rural. 2012**. Monografía del Ganado Equino.

347 **Gadella B, Rath R, Brouwers J, Stout T & Colenbrander B** 2001 Capacitation
348 and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal reproduction science* **68** 249-265.

349 **Heise A, Thompson PN & Gerber D** 2011 Influence of seminal plasma on fresh
350 and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction*
351 *Science* **123** 192-201.

352 **Hernández P, Fernández R, Rodríguez S, Soto M, Verona J & García R** 2012
353 Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine
354 epididymis tail. *Rev Salud Anim* **34** 84-88.

355 **Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K & Sieme H** 2011 Optimal
356 concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified
357 "good" or "poor" for freezing. *Animal reproduction science* **125** 112-118.

358 **James A, Green H, Hoffman S, Landry A, Paccamonti D & Godke R** 2002
359 Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96
360 hours. *Theriogenology* **58** 401-404.

361 **Kholkute S, Meherji P & Puri C** 1992 Capacitation and the acrosome reaction in
362 sperm from men with various semen profiles monitored by a chlortetracycline
363 fluorescence assay. *International journal of andrology* **15** 43-53.

364 **Lucio RA, Tlachi-López JL, Eguibar JR & Ågmo A** 2013 Sperm count and sperm
365 motility decrease in old rats. *Physiology & behavior* **110** 73-79.

366 **Macias GB, Ortega FC, Aparicio I, Miró-Morán A, Morillo RA, Gallardo BJ,**
367 **Gonzalez FL, Balao dSC, Rodríguez MH & Tapia J** 2012 Toxicity of glycerol for
368 the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid
369 peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* **77** 1280-1289.

370 **Martínez-Pastor F, García-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, de**
371 **Paz P & Anel L** 2006 Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from
372 the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* **65** 471-485.

373 **Medeiros A, Gomes G, Carmo M, Papa F & Alvarenga M** 2002 Cryopreservation
374 of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* **273-276**.

375 **Merino R, Luna A, Morales M, Saldívar R & Vidal G** 2004 Respuesta acrosomal
376 de espermatozoides humanos demostrada con clorotetraciclina. *Ginecología y*
377 *Obstetricia de México* **72** 239-246.

378 **Moein-Vaziri N, Phillips I, Smith S, Almiñana C, Maside C, Gil MA, Roca J,**
379 **Martínez EA, Holt WV & Pockley AG** 2014 Heat-shock protein A8 restores sperm

380 membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction* **147** 719-
381 732.

382 **Monteiro G, Papa FO, Zahn F, Dellaqua J, Melo C, Maziero R, Avanzi B,**
383 **Alvarenga M & Guasti P** 2011 Cryopreservation and fertility of ejaculated and
384 epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science* **127** 197-201.

385 **Neild DM, Gadella BM, Chaves MaG, Miragaya MH, Colenbrander B &**
386 **Agüero A** 2003 Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol
387 for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* **59** 1693-1705.

388 **Olaciregui M, Gil L, Monton A, Luno V, Jerez R & Marti J** 2014
389 Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* **68** 91-95.

390 **Papa FO, Melo C, Fioratti E, Dell'Aqua J, Zahn F & Alvarenga M** 2008
391 Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science* **107** 293-301.

392 **Perez-Osorio J, Mello F, Juliani G, Lagares M, Lago L & Henry M** 2008 Effect
393 on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl
394 formamide and varying cooling and freezing procedures. *Anim. Reprod* **3** 5.

395 **Perry R, Naeni M, Barratt C, Warren M & Cooke I** 1995 A time course study of
396 capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised
397 chlortetracycline pattern classification. *Fertility and sterility* **64** 150-159.

398 **Pojprasath T, Lohachit C, Techakumphu M, Stout T & Tharasanit T** 2011
399 Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing
400 extender. *Theriogenology* **75** 1742-1749.

401 **Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM & Gadella BM** 2001 Evaluation of in vitro
402 capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction* **65** 462-470.

403 **Rodríguez-Almeida FA, Ávila Cota CO, Anchondo Garay A, Sánchez-Ramírez**
404 **B & Jiménez Castro JA** 2008 Capacitación espermática inducida por la
405 conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* **42**
406 399-406.

407 **Squires E, Keith S & Graham J** 2004 Evaluation of alternative cryoprotectants for
408 preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* **62** 1056-1065.

409 **Tartaglione C, Puente M & Ritta M** 2009 Espermatozoides epididimarios bovinos:
410 características y habilidad de respuesta in vitro al inductor de reacción acrosomal
411 GABA (ácido gama-aminobutírico). *Revista Argentina de Producción Animal* **29** 29-
412 55.

413 **Toscano I, Olivo I, Núñez R, Cajero M, Val D & Conejo J** 2014 Test de
414 congelación de semen de burro criollo (*Equus Asinus*). *Actas Iberoamericanas de*
415 *Conservación Animal AICA* **4** 94-96.

416 **Wrench N, Pinto C, Klinefelter G, Dix D, Flowers W & Farin C** 2010 Effect of
417 season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal reproduction science* **119**
418 219-227.

419

Tabla 1. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimarios equinos diluidos en medio EDTA-GLUCOSA en fresco a diferentes horas post-mortem.

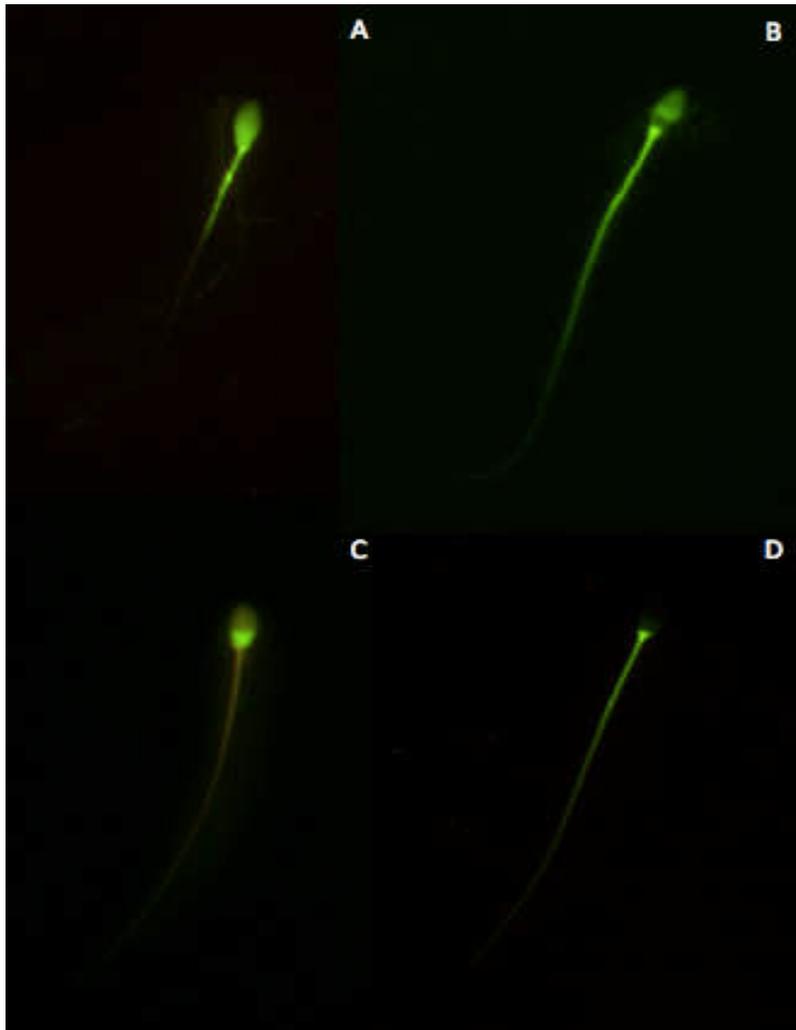
Tx	MP		MT		VIA	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	36.67 \pm 7.60 ^a	18.62	68.33 \pm 6.01 ^a	14.72	79.67 \pm 1.54 ^b	3.78
24 h (n=8)	24.38 \pm 7.04 ^{ab}	19.90	48.75 \pm 8.54 ^{ab}	24.16	90.25 \pm 1.00 ^a	2.82
48 h (n=6)	16.67 \pm 9.19 ^{ab}	22.51	28.67 \pm 13.38 ^{bc}	32.78	78.17 \pm 4.24 ^b	10.38
72 h (n=6)	20.33 \pm 9.87 ^{ab}	24.18	29.17 \pm 12.41 ^{bc}	30.40	73.00 \pm 3.42 ^b	8.37
96 h (n=7)	8.86 \pm 5.47 ^b	14.46	17.86 \pm 7.55 ^c	19.97	70.71 \pm 5.29 ^b	14.01

MP= movilidad progresiva, MT= movilidad total, VIA= espermatozoides vivos, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).

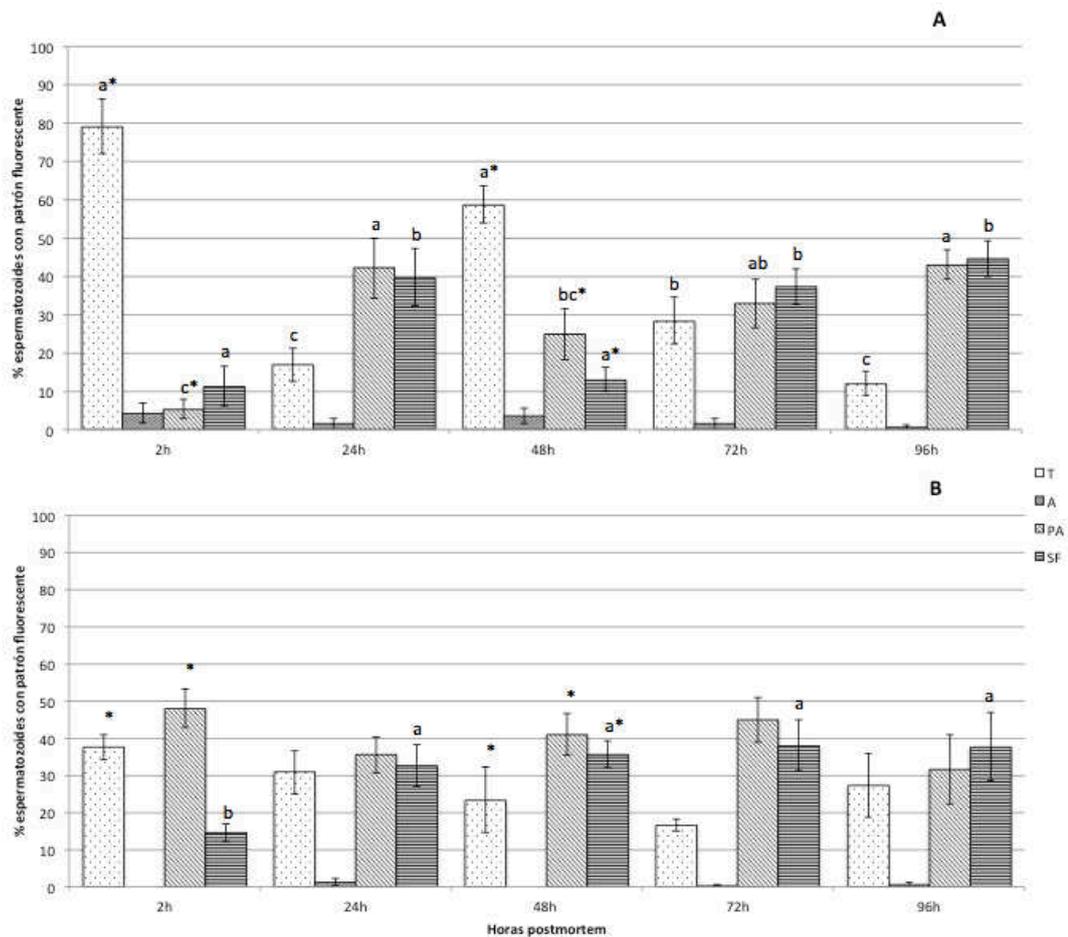
Tabla 2. Media porcentual (\pm EE) y desviación estándar de características espermáticas básicas en espermatozoides epididimarios equinos Post-criopreservados, diluidos en medio EDTA-GLUCOSA y 5% de DMF, a diferentes horas post-mortem.

Tx	MP		MT		VIA	
	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE	Media % \pm EE	DE
2 h (n=6)	5.84 \pm 2.01 ^a	4.92	14.50 \pm 4.35 ^a	10.65	32.17 \pm 4.35 ^{ab}	10.67
24 h (n=8)	13.13 \pm 4.22 ^a	11.93	20.00 \pm 5.35 ^a	15.12	42.50 \pm 3.84 ^{ab}	10.85
48 h (n=6)	3.33 \pm 0.84 ^{ab}	2.07	8.33 \pm 1.05 ^{ab}	2.58	30.84 \pm 5.42 ^{ab}	13.27
72 h (n=6)	10.00 \pm 4.28 ^a	10.49	20.83 \pm 6.38 ^a	15.63	49.17 \pm 5.42 ^a	6.52
96 h (n=7)	1.00 \pm 0.72 ^b	1.91	2.43 \pm 1.45 ^b	3.82	25.71 \pm 5.47 ^b	14.48

MP= movilidad progresiva, MT= movilidad total, VIA= espermatozoides vivos, EE= error estándar, DE= desviación estándar. Valores con diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0.05$).



423 Figura 1. Fotomicrografías fluorescentes de los patrones de clasificación de CTC en espermatozoides
 424 epididimarios equinos obtenidos a diferentes horas post-mortem. A: Fluorescencia verde brillante
 425 uniforme en toda la cabeza (T); B: Fluorescencia en región acrosomal (A); C: Fluorescencia en región
 426 postacrosomal (PA); y D: Sin fluorescencia en la cabeza espermática (SF).
 427



428

429 Figura 2. Gráfico del porcentaje de frecuencia de los patrones fluorescentes encontrados en
 430 espermatozoides epididimales equinos a diferentes tiempos postmortem marcados con CTC antes y
 431 después del proceso de criopreservación. Todo= fluorescencia en toda la cabeza espermática,
 432 Acrosoma= fluorescencia solo en la zona acrosomal sin fluorescencia en el resto de la cabeza,
 433 Postacrosoma= fluorescencia en región postacrosomal sin fluorescencia en zona apical, Nada=
 434 ausencia total de fluorescencia. A) Gráfico que muestra los resultados en espermatozoides obtenidos
 435 en fresco; B) Grafico de la frecuencia encontrada después del proceso de criopreservación. Literales
 436 diferentes dentro del mismo grupo de tratamiento y presencia de asteriscos en el mismo patrón/grupo
 437 en gráficos A y B, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).