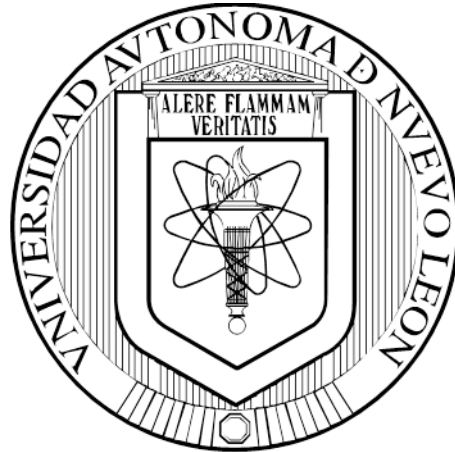


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**EFFECTO DE UN GRADIENTE DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA
CALIDAD DEL SEMEN EQUINO**

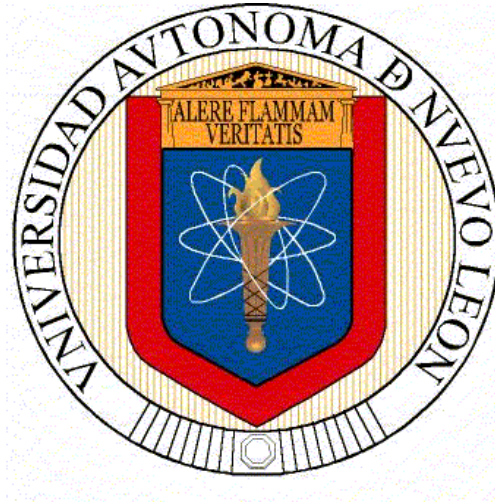
QUE PRESENTA

MVZ. CLAUDIA CONCEPCIÓN MÉNDEZ PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

EFFECTO DE UN GRADIENTE DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA
CALIDAD DEL SEMEN EQUINO

QUE PRESENTA

MVZ. CLAUDIA CONCEPCIÓN MÉNDEZ PÉREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO EN CIENCIA ANIMAL
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EFFECTO DE UN GRADIENTE DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA CALIDAD
DEL SEMEN EQUINO

Aprobación de tesis por el comité particular del
MVZ. Claudia Concepción Méndez Pérez

Dr. Rogelio Alejandro Ledezma Torres

Director de Tesis

Dr. Fernando Sánchez Dávila

Co-director

MVZ. Juan José Vázquez Sánchez

Co-director Externo

MVZ. MC. Gustavo Moreno Degollado

Co-director

Dr. Francisco Javier Picón Rubio

Co-director

“La elaboración de una tesis, no sólo es producto del esfuerzo individual sino también del colectivo, se debe reconocer el mérito propio por alcanzar los objetivos propuestos, aunque sin olvidar que se parte de cero y que solo se puede llegar más lejos porque otros antes han acumulado el conocimiento necesario para hacer progresar el nuestro. Este reconocimiento forma parte de ese sistema social que denominamos ciencia y es un requisito formal e ineludible en la literatura científica y nuestra vida” (Isabel Iribarren).

Dedico el presente trabajo a mi familia: a mi Madre Altagracia Pérez Guel a quien debo mi gratitud por su paciencia inagotable, educación y formación a lo largo de mi vida, a mis hermanas: Esther Méndez, Belem Méndez y sobrinas: Kathia y Camila Enríquez por ayudarme en mi construcción personal y ser un pilar de mi vida, gracias.

A mi esposo quien ha sido el mejor compañero y amigo durante este tiempo y que con su amor ha sido un impulso para seguir en el desarrollo de mis deseos personales y conjuntos, gracias por acompañarme en este camino.

AGRADECIMIENTOS

AL Dr. Rogelio Ledezma y MVZ. Juan José Vázquez, de quienes he aprendido de forma continua, ambos en su respectiva forma y guía me han mostrado que la constancia y dedicación son la base del conocimiento, gracias por su tiempo y paciencia invaluable, ha sido un honor aprender de ustedes.

Al Dr. Fernando Sánchez por sus recomendaciones, revisión y guía en el análisis estadístico.

Al Dr. Francisco Picón por el tiempo destinado a las revisiones y consejos.

Al Hípico La Silla y a los Médicos del Hospital Veterinario La Silla, porque en estos dos años me han brindado su apoyo y paciencia y además me han permitido realizar mi proyecto de tesis e integrarme a su equipo de trabajo.

Al Dr. Juan Villareal Chiu y a la M.C. Yuliana Parra, por la confianza y conocimientos otorgados.

ABREVIATURAS

BCF:	Frecuencia de batida del espermatozoide
CASA:	Sistemas de análisis computarizado
E:	Estrógenos
FSH:	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
IA:	Inseminación artificial
INH:	Inhibina
LH:	Hormona luteinizante
LIN:	Índice de linealidad
MP:	Motilidad progresiva
MT:	Motilidad total
STR:	Rectitud del movimiento
T:	Testosterona
VAP:	Velocidad media de trayectoria
VCL:	Velocidad curvilínea
VSL:	Velocidad en línea recta

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.	Motilidad total y progresiva ($\bar{x}\pm DE$) de acuerdo al volumen de gradiente (0, 14 y 28%) en cada tratamiento (T1: 600g x 20min; T2: 600g x 30min; T3:1000g x 20min y T4: 1000g x 30min), y a la refrigeración a 5°C durante 0, 8 o 24h. 24
Tabla 2.	Motilidad total y progresiva ($\bar{x}\pm DE$) después de centrifugar de acuerdo al tratamiento (T1: 600g x 20min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$). 25
Tabla 3.	Motilidad total y progresiva ($\bar{x}\pm DE$) después del proceso de centrifugación utilizando 0, 14 o 28% volumen de gradiente de centrifugación. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$). 25
Tabla 4.	Motilidad total y progresiva ($\bar{x}\pm DE$) de acuerdo al tiempo en refrigeración a 5°C durante las 0, 8 y 24h. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa. 26
	Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo los tipos de centrifugación (T1: 600g x 20 min, T2:

Tabla 5.	600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa (P<0.05).	26
Tabla 6.	Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo a volúmenes del gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa (P<0.05).	27
Tabla 7.	Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo a los 0, 15 y 30 minutos después de la descongelación. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa (P<0.05).	28
Tabla 8.	Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de las características morfológicas normales, cabezas sueltas (CS), parte media (PM), gota proximal (GP), gota distal (GD) y células redondas (CR) del semen congelado-descongelado para los diferentes tipos de centrifugación (T1: 600g x 20 min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices	28

indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tabla 9.	Promedio ($\bar{x} \pm DE$) de las características morfológicas normales, cabezas sueltas (CS), parte media (PM), gota proximal (GP), gota distal (GD) y células redondas (CR) del semen congelado-descongelado con diferentes volúmenes del gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).	29
Tabla 10	Porcentaje de recuperación de espermatozoides ($\bar{x} \pm DE$) para cada uno de los tipos de centrifugado (T1: 600g x 20 min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).	30
Tabla 11.	Porcentaje de recuperación de espermatozoides ($\bar{x} \pm DE$) de acuerdo al volumen de gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).	30

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	6
Tracto Reproductor del macho equino vista de disección.	
Estructuras del Espermatozoide Equino.	
Vistas magnificadas del espermatozoide equino, vista medio sagital (izquierda), vista parcialmente seccionada (derecha). Varias divisiones del espermatozoide están representadas como cabeza, flagelo (cola), pieza media, pieza principal y pieza final, (a) acrosoma, (b) membrana plasmática, (c) núcleo, (d) mitocondria, (e) axonema, (f) fibras densas externas, (g) capa fibrosa, (h) microtúbulos.	
Figura 2.	9
Diagrama demostrativo de cómo los instrumentos de análisis computarizado calculan los parámetros de velocidad, VAP, VSL y VCL a partir de la trayectoria del espermatozoide.	
Figura 3.	14
Representación esquemática del proceso del eyaculado usando la centrifugación coloidal y los tratamientos de centrifugación.	
Figura 4.	19

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1.1. Objetivo.....	4
1.2. Hipótesis.....	4
1.3. Justificación.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Anatomía del macho.....	5
2.2. Espermatogenesis.....	6
2.3. Anatomía y fisiología del espermatozoide equino.....	7
2.4. Colección y evaluación.....	9
2.5. Refrigeración.....	10
2.6. Congelación.....	10
2.7. Evaluación de semen.....	12
2.7.1. Concentración espermática.....	12
2.7.2. Morfología espermática.....	12
2.7.3. Motilidad espermática.....	13
2.7.4. Evaluación de la integridad del ADN.....	14
2.8. Técnicas de selección espermática.....	15

2.8.1. Lavado de espermatozoides.....	15
2.8.2. Migración de espermatozoides motiles (Swim up / Swim down).....	15
2.8.3. Técnicas de adherencia espermática.....	16
2.8.4. Gradiente de Centrifugación.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Lugar del estudio.....	18
3.2. Animales experimentales, mantenimiento y alimentación.....	18
3.3. Colección de semen.....	18
3.4. Procesamiento de semen.....	18
3.5. Centrifugación Coloidal.....	19
3.6. Refrigeración.....	20
3.7. Congelación del semen.....	20
3.8. Evaluación de la concentración espermática.....	21
3.9. Análisis de Motilidad Espermática.....	21
3.10. Morfología espermática.....	22
3.11. Diseño experimental del estudio.....	22
3.12. Análisis estadístico.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Evaluación de parámetros de motilidad del semen refrigerado.....	24
4.2. Evaluación de parámetros de motilidad del semen congelado– descongelado.....	26

4.3. Evaluación de morfología del semen congelado–descongelado.....	28
4.4. Evaluación de la recuperación del semen congelado–descongelado.....	29
5. DISCUSIÓN.....	31
6. CONCLUSIONES.....	35
7. BIBLIOGRAFIA.....	36

RESUMEN

El procesamiento del semen en equinos es aún una oportunidad de estudio para mejorar la calidad seminal en la reproducción asistida, es por eso que se han diseñado técnicas como el uso de gradientes de centrifugación. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la motilidad, dinámicas de movimiento, morfología y recuperación de las células espermáticas del semen equino durante el proceso de enfriamiento y después de la criopreservación utilizando un gradiente de centrifugación. Las motilidades y dinámicas de movimiento fueron motilidad total (MT) y progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media de trayectoria (VAP), velocidad en línea recta (VSL), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR) y frecuencia de batida del espermatozoide (BCF), morfología y recuperación espermática después de los diferentes tratamientos (T1: 600g por 20 minutos, T2: 600g por 30 minutos, T3: 1000g por 20 minutos y T4: 1000g por 30 minutos) con un volumen coloidal de 0, 14 o 28% durante las 0, 8 y 24h en semen frío (5°C) y después del proceso de criopreservación utilizando un total de 24 eyaculados. Los resultados de acuerdo al volumen del gradiente durante el proceso de enfriamiento fueron superiores en la MT con 60 y 70% y MP 57 y 59% para los tratamientos con 14, 28% respectivamente comparados con el grupo control 0% con porcentajes para MT con 55% y una MP con 43% ($P < 0.05$). En el tipo de centrifugación el T1 y T2 fueron superiores con 71 y 70% de MT y 59% de MP, comparados con los T3 y T4 con MT de 57% y 60% y una MP 45 y 49%, respectivamente ($P < 0.05$). Después del proceso de congelación, la MT (38%) y MP (30%) fueron superiores para los volúmenes de gradiente comparados con el testigo (0%) ($P < 0.05$). En cuanto al tipo de centrifugación, los valores fueron superiores para los T1 y T2 para MT de 36.4 y 33%, MP 30.2 y 27%, VAP 53%, STR 77 y 78% comparados con los T3 y T4 MT de 31 y 34%, MP 23.9 y 27.1%, VAP 50 y 51%, STR 74.5 y 75.5%, para los porcentajes de células normales fueron superiores para T1 y T2 con 52 y 50% y para T3 y T4 con 47.5 y 48.1%, los T1 y T2 presentaron menores porcentajes de anomalías en cabeza, gotas proximales, gotas distales y defectos en cola comparados con T3 y T4 ($P < 0.05$), de acuerdo al volumen de gradiente el 14 y 28% tienen un aumento en el porcentaje de células normales de 51.1 y 52.4% respectivamente comparado con el 0% del gradiente con 45.4%, el uso del 14 o 28%

reduce las anomalías de cabeza, cabezas sueltas, gotas proximales y células redondas comparadas con el grupo del 0% de gradiente ($P < 0.05$), en cuanto a los porcentajes de recuperación fueron menores con un $55 \pm 1.2\%$ para el uso del gradiente comparado con un $76 \pm 1.2\%$ sin el uso del gradiente ($P < 0.05$). En conclusión, el uso del gradiente mejora las características de evaluación independientemente de la gravedad y el tiempo de centrifugación en el enfriamiento del semen y después del proceso de congelación, por lo cual la inclusión en ambos procesos resulta en una población espermática superior para producir semen refrigerado y criopreservado de mejor calidad.

Palabras Clave: Semen, equino, refrigeración, congelación, gradiente de centrifugación.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la inseminación artificial (IA) ha aportado grandes ventajas a la reproducción animal durante los últimos 15 años, aprovechando el potencial genético de sementales de alta calidad, mejorando el control sanitario, evitando daños durante la monta o el transporte de animales e incluso mejorando los resultados de fertilidad en casos de yeguas sub-fértiles. La IA se realiza usando semen fresco, refrigerado o congelado; el semen equino es muy sensible a la manipulación y a los procesos de conservación, dado que durante el procesamiento y almacenamiento, los espermatozoides sufren daños irreversibles a la integridad estructural, bioquímica y biofísica que disminuyen la calidad del semen (Ball, 2008; Brum *et al.*, 2008). Sin embargo, estos cambios no son iguales en todos los sementales, ya existe una gran variabilidad individual de tolerancia a las procesos, esto se traduce en que un tercio de los sementales no soportan el proceso de refrigeración (Allen, 2005), aunado a los problemas que puedan tener los sementales subfértiles. En el caso de la criopreservación, solo el 30% de sementales tienen una buena capacidad de congelación, independientemente de su fertilidad en monta natural.

Debido a todo lo anterior, en la práctica clínica actual se busca incrementar la calidad del semen mediante diferentes técnicas para mejorar su preservación mediante enfriamiento y/o congelación (Loomis and Graham, 2008). Dentro de estas técnicas está el uso de los gradientes de centrifugación que se utilizan para seleccionar los espermatozoides de mayor calidad en los casos de oligoespermia, teratozoospermia o asthenozoospermia; esta técnica ha probado mejorar la condición en varias especies, en semen fresco y después de la congelación (Ramires-Neto *et al.*, 2004). Una de las desventajas de esta técnica es el bajo volumen de centrifugación y la recuperación, aumentando los costos y el tiempo en el proceso, además no existe suficiente información que evalúe la utilización del gradiente de centrifugación antes de la criopreservación, ni el volumen del gradiente que permita obtener los mejores resultados en la calidad de los espermatozoides; por lo que éste estudio tiene como propósito determinar el volumen coloidal y tiempo óptimo en la centrifugación que permita obtener la mayor calidad de células espermáticas del semen equino frío o criopreservado.

1.1. Objetivos

1. Evaluar la motilidad, dinámicas de movimiento, morfología y recuperación de las células espermáticas del semen equino durante el proceso de enfriamiento y después de la criopreservación utilizando un gradiente de centrifugación.

2. Evaluar la motilidad (Total, progresiva, velocidad curvilínea, velocidad media de trayectoria y velocidad en línea recta), morfología y recuperación espermática después de centrifugar a 600 o 1000g durante 20 o 30 min con un volumen coloidal de 0, 14 o 28% durante las 0, 8 y 24h en semen frío (5°C) y después de la congelación-descongelación.

1.2. Hipótesis

El volumen coloidal y la centrifugación previo al proceso de preservación puede mejorar la calidad del semen equino al momento de la refrigeración y congelación del mismo.

1.3. Justificación

El uso de los gradientes de centrifugación es una técnica de procesamiento de semen que ha demostrado seleccionar algunas características de los eyaculados. Desde este punto de vista el uso del gradiente podría ayudar a incrementar la calidad del semen procesado durante el proceso de refrigeración o criopreservación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía del Macho

El aparato reproductor del caballo consta de dos testículos, glándulas accesorias (Una ámpula o ampolla, un par de glándulas vesiculares, una próstata y un par de glándulas bulbouretrales) y el pene (Conformado por los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso y la uretra). Cada testículo tiene un epidídimo ubicado lateralmente que se divide en cabeza (Parte superior del testículo), cuerpo (Abarca casi toda la longitud del testículo) y cola (Parte inferior del testículo). Las glándulas vesiculares, próstata y las bulbouretrales, que comúnmente son llamadas glándula accesorias. El aparato reproductor está suspendido dentro de la cavidad pélvica por el saco genital y externamente por el escroto y el prepucio (McKinnon *et al.*, 2011).

Los testículos tienen un papel muy importante en la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la secreción de hormonas para la función normal del epidídimo y de las glándulas accesorias, así como en la expresión de la conducta sexual. La producción y eyacuación de espermatozoides normales en números adecuados es necesaria para la reproducción, cuando algunas de las partes que integran el aparato reproductor no funciona de manera normal la probabilidad de la concepción y posterior desarrollo del embrión se reduce.

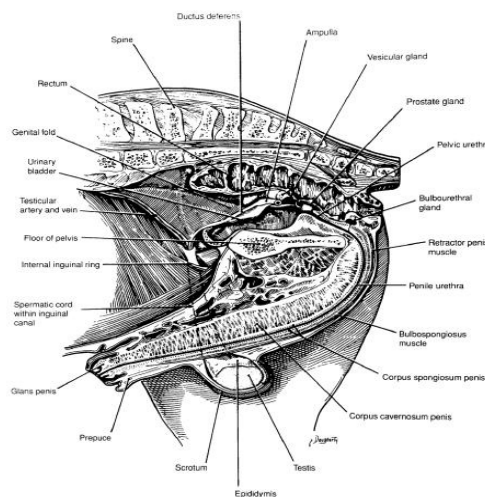


Figura 1. Tracto Reproductor del macho equino vista de disección lateral (Modificado de Pickett *et al.*, 1989)

2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso cronológicamente organizado que involucra la multiplicación y diferenciación de las células germinales (espermatogonias) localizadas en el epitelio seminífero del testículo, que resulta en la formación de células especializadas llamadas “espermatozoides” que constituyen el gameto del macho. La espermatogénesis se puede dividir en espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis, con una duración final de 57 días. La espermatocitogénesis es un ciclo de proliferación de las espermatogonias por medio de la mitosis para producir espermatocitos primarios y al mismo tiempo generar nuevamente un número propio y continuar con la línea de células germinales, con una duración de 19.5 días en los caballos (garañones). La meiosis consiste en la formación de espermatocitos secundarios y espermátides haploides a partir de los espermatocitos primarios y tiene una duración de 19.4 días. En cambio, la espermiogénesis consiste en la metamorfosis de una población de espermátides en espermatozoides maduros que poseen una cabeza aplanada con el núcleo condensado y una vesícula con enzimas especializadas y la cola que es necesaria para la motilidad. La espermiogénesis no involucra divisiones celulares y tiene una duración de 18.6 días. Después de abandonar los testículos, los espermatozoides son transportados al epidídimo, donde finalmente ocurre la maduración y adquieren la habilidad de fertilización, proceso que dura de 9 a 14 días. Es entonces que los espermatozoides presentes en el eyaculado se han producido entre 66 a 71 días, por lo tanto, la morfología espermática es un reflejo de los eventos ocurridos en 2 meses anteriores que influyeron en transporte y maduración de los espermatozoides a través del epidídimo (Aman, 1993; Brito, 2007).

Está bien establecido que en la mayoría de los mamíferos, incluyendo a los equinos, la función testicular normal es dependiente de la glándula pineal y del eje hipotalámico-pituitario- testicular. La glándula pineal secreta melatonina que actúa en el hipotálamo para regular la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH estimula la secreción de las hormonas pituitarias, la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH), la cuales ejercen su función en los testículos. Subsecuentemente, las hormonas testiculares, inhibina (INH), estrógenos (E) y la testosterona (T) son secretadas en la circulación sanguínea y actúan por medio del

mecanismo de retroalimentación (feed back) regulando la liberación de hormonas del hipotálamo y la glándula pineal. Estudios recientes en los equinos han demostrado que otras hormonas pudieran estar involucradas como son opioides, prolactina, hormona del crecimiento, hormonas tiroideas y activina. Además, la evidencia indica que factores locales paracrinós-autocrinós dentro de los testículos modulan la esteroidogénesis y la espermatogénesis (Roser, 2008).

2.3. Anatomía y fisiología del espermatozoide equino

El espermatozoide consta de cabeza, cuello y cola. La cola es la parte más larga del espermatozoide y se forma de la pieza media, pieza principal y pieza final. La medida de un espermatozoide equino es aproximadamente de 60µm y se encuentra rodeado en su totalidad por la membrana plasmática o plasmalema (firmemente unida al margen caudal de la cabeza), el anillo (annulus) y longitudinalmente a las columnas de la pieza principal, la membrana plasmática cambia en su composición durante el desarrollo y maduración, su función principal es prevenir el movimiento de proteínas y lípidos de la cabeza hacia la cola (Brito, 2007; O'Brien, 1994). La membrana plasmática es formada por una bicapa lipídica que contiene una porción hidrofílica externa e hidrofóbica interna, los fosfolípidos contienen glicerol y una cadena de ácidos grasos capaces de moverse lateralmente influyendo sobre la permeabilidad de la membrana (Lodish *et al.*, 1995; Aman, 1987).

La cabeza del espermatozoide está formada por el acrosoma, la lámina post acrosomal y el núcleo. Los dos tercios anteriores del núcleo están recubiertos por el acrosoma, el cual es una vesícula especializada formada de una doble membrana que contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la penetración del espermatozoide al óvulo. El núcleo ocupa la mayoría de la cabeza del espermatozoide y contiene el material genético (ADN) altamente condensado. El núcleo está contenido por una doble envoltura nuclear que se adelgaza de la parte basal, lo que permite que se una la cabeza al capitulum del cuello. La pieza conectora forma un segmento que liga el flagelo y la cabeza. Sus principales componentes son capitulum (una estructura fibrosa con forma de cúpula) y las columnas segmentadas. El capitulum es el sitio donde se posiciona el centriolo proximal, en ángulo recto al eje del flagelo. La unión entre la

cabeza y la cola está mediada por filamentos de capitulum y la placa basal en la superficie caudal del núcleo, permitiendo cierta flexibilidad al cuello.

El cuello del espermatozoide es un segmento corto de unión entre la cabeza y la cola, contiene la pieza de conexión, el centriolo proximal y muchas mitocondrias pequeñas. La pieza media está formada por el axonema rodeado por las fibras densas exteriores y la membrana mitocondrial; se extiende desde el extremo final caudal del cuello hasta el anillo (anillo de Jensen). El axonema contiene 9 microtúbulos cilíndricos dobles, los cuales son los elementos que se contraen para producir el movimiento de la cola del espermatozoide, aproximadamente 60 mitocondrias por espermatozoide, son las encargadas de producir la energía necesaria para la motilidad del espermatozoide. En la parte final caudal de la membrana mitocondrial se encuentra el anillo de Jensen que consiste de subunidades filamentosas orientadas circunferencialmente entre el giro caudal de la mitocondria y el extremo final anterior de la membrana mitocondrial de la pieza principal, esta delimita el final de la pieza media y es el punto donde la membrana plasmática se une firmemente.

La pieza principal mide aproximadamente de 30 a 44 μ m y es el segmento más largo de la cola. El axonema y las fibras densas de la pieza media continúan a través de la pieza principal pero las fibras se estrechan terminando en diferentes niveles de la pieza principal, proporcionando soporte y flexibilidad necesaria para el movimiento de deslizamiento translacional ya que no es capaz de contraerse. La pieza final es la parte más corta del segmento de la cola conteniendo solamente el axonema (Brito, 2007).

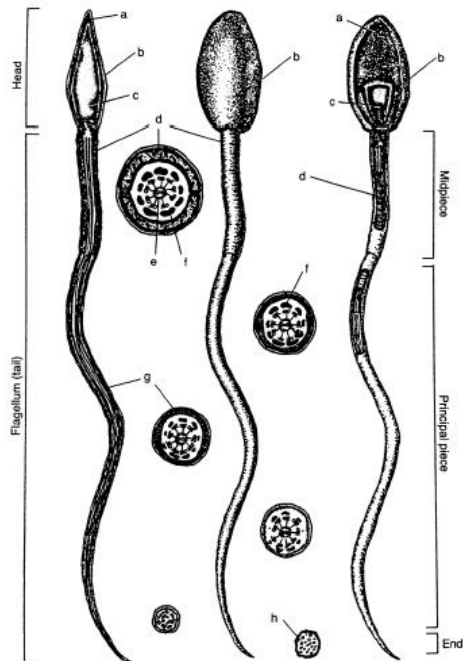


Figura 2. Estructuras del Espermatozoide Equino. Vistas magnificadas del espermatozoide equino, vista medio sagital (izquierda), vista parcialmente seccionada (derecha). Varias divisiones del espermatozoide están representadas como cabeza, flagelo (cola), pieza media, pieza principal y pieza final, (a) acrosoma, (b) membrana plasmática, (c) núcleo, (d) mitocondria, (e) axonema, (f) fibras densas externas, (g) capa fibrosa, (h) microtúbulos (Varner y Johnson, 2011).

2.4. Colección y Evaluación

La inseminación artificial, es el proceso a través del cual se coloca semen dentro del tracto reproductivo femenino para lograr una gestación, esta técnica se ha utilizada por muchos años y ha sido difundida ampliamente en el mundo. Las razones por las cuales su uso ha sido amplio son debido a que previenen enfermedades infecciosas, más seguro para el personal y para el semental, un eyaculado puede producir varias gestaciones, elimina la necesidad de adquirir un semental, sin embargo, en el caso de los equinos ha sido menos distribuido su uso comparado con otras especies mayores, a casusa de las dificultades para la supervivencia espermática durante el transporte y su procesamiento y la considerable variación entre la calidad de los eyaculados de los garañones.

La colección de semen es una parte integral de los programas de inseminación artificial y la evaluación reproductiva del semental. Las técnicas adecuadas de colección deben ser empleadas de manera que el personal y el semental no se vean arriesgados, así como minimizar las alteraciones iatrogénicas y medio ambientales en la calidad del semen.

Existen un número de métodos de colección, con ventajas y desventajas que dependen de diferentes situaciones estos métodos incluyen el uso de la vagina artificial, uso de condón y la eyaculación inducida farmacológicamente; el método de colección más usado es mediante la vagina artificial, existen varios modelos en los que se busca conservar una temperatura de entre 44-50°C y una buena presión.

2.5. Refrigeración

El desarrollo de técnicas de refrigeración o enfriamiento ha permitido mantener el potencial fértil del semen por periodos prolongados de tiempo, este proceso proporciona ventajas como la reducción en el transporte de los animales, gastos asociados al alojamiento, así como menor riesgo en la transmisión de enfermedades, sin embargo se han encontrado factores que pueden estar asociados al deterioro en la calidad del semen y ocasionar una reducción en la capacidad de fertilización del espermatozoide como la concentración, plasma seminal, reducción en substratos metabolizables, incremento en los productos de desecho, producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y la temperatura de almacenamiento (Love *et al.*, 2012; Borgan *et al.*, 2015; Freitas-Dell *et al.*, 2013).

Existen múltiples referencias a cerca de la dilución correcta del semen para el proceso de refrigeración, un protocolo recomendado es, el semen deberá diluirse al menos a una razón de 1:3 (semen:diluyente); concentración de 25-50 millones de espermatozoides por ml, manteniendo un rango de enfriamiento entre -0.1°C y -0.05°C por minuto durante las temperaturas de 19°C a 8°C, para luego mantenerse en una temperatura de 4 a 6°C durante 24 a 48 horas (McKinnon *et al.*, 2011).

2.6. Congelación

La congelación es una importante herramienta de la biotecnología para eliminar la diseminación de enfermedades, las barreras geográficas y preservar el material genético de un semental genéticamente superior por un período indefinido de tiempo (Ramires-Neto *et al.*, 2004; Mazier *et al.*, 2013). Además, es una parte integral de los programas de reproducción asistida, así como situaciones que involucran bajas tasas de fertilidad en el macho y bancos de semen. Sin embargo, la criopreservación induce

una serie de cambios al espermatozoide como son daño osmótico, químico y mecánico, reduciendo la capacidad de fertilización; así mismo el daño causado por el procesamiento es acumulativo y pequeñas lesiones pueden resultar en un cambio demeritorio al final del proceso (Dorado *et al.*, 2013); durante el almacenamiento del semen a bajas temperaturas los espermatozoides equinos son sometidos a daño oxidativo a la membrana fosfolipídica ocasionando la externalización de la fosfatidilserina, daño a las proteínas y a la cromatina, factores que están asociados con una reducción en la fertilidad (Ball, 2008; Ball *et al.*, 2008; Fatehi *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006).

Como protocolo estándar se ha utilizado la dilución de la fracción libre (sin gel) del eyaculado con un diluyente de centrifugación (25-50 millones/ml) y centrifugar a 400-600g durante 8-15 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender con un diluyente de congelación, empacar el semen a una concentración de 200 millones/0.5ml, posteriormente para la criopreservación es sugerido un rango de enfriamiento en el cual se descienda la temperatura de la muestra a $-0.03^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 5°C , después ir bajando gradualmente $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta que la muestra alcance los -80°C y después reducir $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los -120°C y finalmente colocar las pajillas en nitrógeno líquido a -196°C (Mc Kinnon, 2006; Loomis, 2006; Maziero *et al.*, 2013).

El semen de los equinos es criopreservado generalmente usando diluyentes con base de leche, yema de huevo y recientemente el glicerol y amidas como crioprotectores. Se ha encontrado que el uso de un diluyente (Botu-crio, Botupharma, Brazil) que contiene glicerol y metilformamida muestra una mejor criopreservación de las células espermáticas en el equino, protegiendo la integridad del espermatozoide concluyendo que las células espermáticas presentan mejores parámetros cinéticos comparados con otros diluyentes (Ramires-Neto *et al.*, 2004; Papa *et al.*, 2008).

2.7. Evaluación de semen

El principal objetivo de los análisis de las evaluaciones de semen es determinar el potencial de fertilidad de una muestra de semen, usando procedimientos rápidos y no costosos.

Las correlaciones de fertilidad entre las muestras de semen y los resultados de pruebas de laboratorio varían de gran manera que los estudios revisados mencionan que la correlación entre fertilidad y motilidad espermática varía de 0.15 a 0.84; entre fertilidad y morfología entre de 0.06 a 0.86 y la correlación entre fertilidad y a viabilidad celular de 0.33 a 0.66; una parte del problema para correlacionar los resultados de laboratorio con la fertilidad es que ésta es afectada por el número de espermatozoides con el que son inseminadas un número de yeguas, además de los problemas inertes en el procesamiento del semen (Graham, 2001).

2.7.1. Concentración espermática

La concentración espermática es determinada por el conteo de las células, ya sea utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, un análisis fotométrico o un análisis basado en fluorescencia (Varner, 2008).

2.7.2. Morfología espermática

La evaluación morfológica de los espermatozoides es un componente esencial del análisis del semen y proporciona información invaluable para determinar la salud del semental y su potencial de fertilidad. En promedio un semental debe de tener un 50% de espermatozoides morfológicamente normales aunque puede variar considerablemente durante la temporada reproductiva y en las evaluaciones rutinarias. Se considera un eyaculado de baja calidad cuando son encontrados porcentajes superiores al 30% de defectos en la cabeza, 25% de gotas citoplasmáticas proximales o 40% de espermatozoides anormales (Brito, 2007).

La Sociedad de Teriogenología (SFT) recomienda el uso de la técnica de preparación "Wet-Mount" y el uso de un microscopio de contraste de fases o diferencial de interferencia para la evaluación de la morfología en sementales, siendo esta técnica

más sensible para la identificación de espermatozoides anormales comparado con otras técnicas como las tinciones (Brito, 2011).

2.7.3. Motilidad espermática

La motilidad espermática continúa siendo una de las características más importantes cuando se hace la evaluación seminal a pesar de su pobre correlación con la fertilidad. La motilidad es generalmente considerada como un reflejo de la viabilidad de espermatozoides en una muestra. Espermatozoides no motiles o pobremente motiles son considerados incapaces de fertilizar sin la ayuda de técnicas de reproducción asistida. La estimación manual a través del microscopio resulta una técnica imprecisa, poco acertada y subjetiva; por otra parte, es de bajo costo y simple de realizarse, siendo requerida experiencia, entrenamiento y supervisión por parte del personal del laboratorio. Los sistemas de análisis computarizado (CASA) otorgan información precisa y acertada con una variedad de características de movimiento del espermatozoide y pueden ser utilizadas para obtener una evaluación objetiva de la motilidad (Hoogewijs *et al.*, 2012). Existen diferentes dispositivos y marcas que utilizan los sistemas CASA siendo los analizadores espermáticos más comunes CEROS o IVOS de la compañía Hamilton Thorne (Baumber-Skaife, 2011).

Los sistemas CASA obtienen la evaluación a través de algoritmos basada en el movimiento de la cabeza del espermatozoide y su dimensión, además pueden realizar un análisis de movimiento a través de videocámaras adaptadas al microscopio capturando diferentes cuadros en los cuales se determinan las características del movimiento espermático incluyendo velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud (STR) y frecuencia de batida del espermatozoide (BCF) (Let *et al.*, 2002; Baumber-Skaife, 2011).

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

el obtener valores alto, se puede pensar en un alto potencial de fertilidad (López-Fernández *et al.*, 2007).

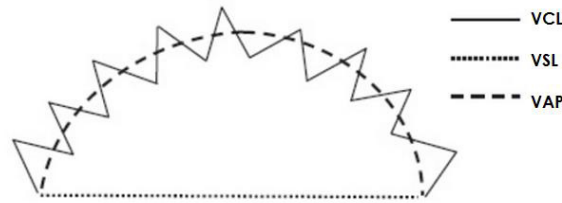


Figura 3. Diagrama demostrativo de cómo los instrumentos de análisis computarizado calculan los parámetros de velocidad, VAP, VSL y VCL a partir de la trayectoria del espermatozoide.

2.7.4. Evaluación de la integridad del ADN

Los métodos tradicionales de laboratorio no son capaces de determinar de forma precisa la fertilidad del semen criopreservado. Los espermatozoides con daño en la cromatina estructuralmente parecen normales en términos de integridad de membrana, morfología y motilidad, pero el uso de estos también podría resultar en fallos post fertilización y muerte embrionaria (Fatehi *et al.*, 2006; Gutierrez-Cepeda *et al.*, 2012).

Aunque la preservación de la función de la membrana espermática y la motilidad son importantes evaluaciones de la calidad de los espermatozoides, pueden no revelar patologías inertes asociadas con la configuración del ácido desoxirribonucleico (ADN). Recientemente el análisis de la fragmentación del ADN y la estabilidad de la cromatina han ayudado a discriminar la infertilidad de los individuos con espermigramas normales. Este enfoque es interesante mientras que la fragmentación del DNA esta pobremente correlacionada con los parámetros clínicos de la calidad espermática, tal como la exclusión del análisis de daño del DNA, lo que puede resultar en un factor de infertilidad no detectado. Existe una creciente evidencia de que el estatus de la cromatina espermática al tiempo de la fertilización puede influenciar en la sobrevivencia embrionaria y esta puede contar como una proporción significativa de las que son típicamente consideradas a factores de infertilidad de la hembra (López-Fernández *et al.*, 2007).

Dentro de los métodos para evaluar la integridad del ADN se encuentran las pruebas de dispersión de la cromatina (SCD), que ha demostrado su efectividad en analizar la fragmentación del ADN en humanos y otros mamíferos. La prueba de SCD produce una evaluación consistente de la calidad del ADN y puede ser registrada por observación microscópica y discriminar entre un halo producido por la dispersión de la cromatina en la cabeza y un espermatozoide que no produce un halo (Cortés-Gutierrez *et al.*, 2009).

2.8. Técnicas de selección de espermatozoides

Dado que los sementales no son seleccionados con base en su fertilidad o calidad seminal, existe un interés particular de los teriogenólogos en usar técnicas de selección espermática para mejorar la calidad y el potencial para la criopreservación de eyaculados de baja calidad o astenospermia de sementales que de otra manera no serían adecuados para refrigeración o congelación (Loomis, 2006).

2.8.1. Lavado de espermatozoides

La técnica de lavado de espermatozoides permite recuperar mejor calidad de espermatozoides en cuanto a concentración y motilidad, el procedimiento consiste en lavar los espermatozoides en un medio estéril adicionado con albumina humana a través de un proceso de centrifugación y resuspensión, a pesar de la simplicidad y velocidad del método; sin la separación de los espermatozoides de buena calidad de los leucocitos y células muertas pueden producirse radicales libres de oxígeno y dañar la función espermática (Loomis, 2006).

2.8.2. Migración de espermatozoides motiles (Swim up / Swim down)

Es la técnica más común utilizada en los laboratorios de fertilización in vitro y de elección para eyaculados con una buena concentración, por medio de esta técnica son seleccionados los espermatozoides de acuerdo a su capacidad para nadar a través del plasma seminal, pero igual que la técnica de lavado de espermatozoides si no son retirados células que produzcan radicales libres de oxígeno (ROS), la calidad del semen recuperado se vería afectado (Manafi, 2011).

2.8.3. Técnicas de adherencia espermática

Esta técnica ha sido usada para retirar espermatozoides muertos previo al proceso de criopreservación, utilizando la tendencia de los espermatozoides muertos o dañados de adherirse a las superficies de vidrio y la adherencia a camas de polisacáridos, mostrando un incremento en la motilidad y fertilidad (Loomis, 2006).

2.8.4. Gradiente de Centrifugación

La centrifugación a través de gradientes ha llegado a ser relativamente común en las técnicas de preparación del semen, como un procedimiento para mejorar la calidad espermática en eyaculados con bajos porcentajes en motilidad, morfología y concentración (Manafi, 2011). El uso de diferentes concentraciones de partícula coloidal de sílice a un gradiente de densidad discontinuo, el espermatozoide es separado por gravedad específica en capas fundado en un punto isopícnico. Los espermatozoides con anomalías morfológicas son menos boyantes o no se precipitan lo suficiente, permitiendo su retención en la superficie del gradiente de centrifugación. Los gradientes poseen ventajas comparadas con otros métodos de separación espermática, pero la principal es que las partículas de sílice no penetran a la membrana celular. Además, el sílice no causa estrés osmótico al espermatozoide cuando se agrega a algún medio de cultivo y puede ser formulado para crear una alta gravedad específica para separar células densas; así mismo tiene baja viscosidad para no interferir con la sedimentación espermática (Edmond *et al.*, 2012; Loomis, 2006).

En años recientes se ha desarrollado un producto comercial (Equipure) que es un medio de gradiente de centrifugación que contiene partículas de sílice para su uso en el procesamiento de semen de sementales equinos. Los estudios iniciales con este producto indican que tiene mejoría significativa en la calidad del semen después de la centrifugación fraccional. El uso de una capa de solución de sílice coloidal mejora la calidad del semen equino al seleccionar espermatozoides motiles morfológicamente normales y reducir las concentraciones bacterianas (Edmond *et al.*, 2008), también la morfología, viabilidad y varios tipos de defectos morfológicos fueron removidos por medio del gradiente discontinuo, logrando un alto porcentaje de espermatozoides normales en el pellet. Las anomalías atrapadas por el gradiente más

frecuentemente fueron células prematuras germinales, cabezas sueltas y gotas proximales con un 40% del gradiente (Macpherson *et al.*, 2002, Ramires-Neto *et al.*, 2012), mientras que las cabezas de forma anormal y defectos en pieza media, colas dobladas y colas enrolladas fueron atrapadas utilizando un 40 o 80% de gradiente (Macpherson *et al.*, 2002). Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2011), obtuvieron valores mayores en movimiento lineal y rectilíneo y menor grado en el índice de fragmentación de ADN. Además, reduce la cantidad de células no seminales y la concentración de mieloperoxidasa en semen después de la criopreservación utilizando en la centrifugación un 40 o 80% de Equipure (Ponthier, 2013).

La centrifugación coloidal pre-criopreservación del semen equino puede incrementar el número de espermatozoides morfológicamente normales así como mejorar la motilidad espermática, la integridad de la membrana y viabilidad. Indudablemente la centrifugación coloidal selecciona los espermatozoides con intacta y madura cromatina, las cuales tienen mayor densidad que las dañadas o inmaduras, además el retiro de los leucocitos o espermatozoides dañados puede ayudar a mantener la integridad de la cromatina, previniendo el daño posterior por las especies reactivas de oxígeno.

Respecto al uso de otras técnicas de preparación de semen la técnica de gradientes produce menos cantidad de células productoras de radicales libres de oxígeno, recuperando espermatozoides con un DNA integro, se ha encontrado que un daño a la integridad del DNA está asociado con bajos porcentajes de preñez (Manafi, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del estudio

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de abril y agosto de 2014 en el Laboratorio de Procesamiento de Semen del Club Hípico la Silla, en conjunto con el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

3.2. Animales experimentales, mantenimiento y alimentación

Se utilizaron 6 caballos de salto de raza “Caballos Deportivos La Silla”, los cuales tenían una motilidad progresiva espermática >40% al momento de la colección. Las edades de los animales fueron 7, 8, 6, 6, 7 y 7 (\bar{x} 6.8 años) y los pesos fueron 516, 571, 533, 514, 561y 564, respectivamente (\bar{x} 543.1kg).

3.3. Colección de semen

Se obtuvieron 4 eyaculados de cada garañón con un total de 24 eyaculados ($n = 6$, $r = 4$). El semen fue colectado de manera regular (dos colecciones / semana) por medio de vagina artificial (Missouri Model; Nasco, Fort Atkinson), llenada con agua a una temperatura entre 50-55°C y lubricada con gel no espermicida (IMV, Technologies, L’Aigle). Se utilizó un dummy y una yegua ovariectomizada previamente tratada con 10 mg de cipionato de estradiol intramuscular cada 7 días para inducir el estro y estimular al garañón y facilitar la colección de semen. Antes de cada colección, el pene fue lavado con agua tibia a 37°C. La medición del volumen de cada eyaculado fue por medio de una probeta graduada y se tomó una gota para colocarla en el fotómetro de acuerdo al procedimiento (Sperma CUE, Minitube®) y medir la concentración espermática (millones/ml).

3.4. Procesamiento de semen

Inmediatamente después de la colección de cada eyaculado ($n = 24$), el semen fue llevado al laboratorio para su filtración y evaluación; y fue puesto en la incubadora a 37°C, una vez filtrado el semen fue diluido usando un diluyente comercial de fórmula básica (E-Z Mixin-BF®; Animal Reproduction Sistem) 1:1 (v/v). Se tomó un 1ml y se

colocó en un alícuota para obtener los datos considerados para la motilidad espermática.

3.5. Centrifugación Coloidal

Para el proceso de centrifugación con el gradiente de centrifugación se utilizaron tubos cónicos de polipropileno con capacidad de volumen de 50ml (Coring Life Sciences), donde se colocaron 1000 millones de espermatozoides por tubo con un volumen de diluyente de 35, 30 y 20ml y un volumen del gradiente de centrifugación (EquiPure TM Nidacon, International AB) de 0% (0ml), 14% (5ml) y 28% (10ml) correspondientemente (Figura 4).

El coloide fue agregado una vez que el semen diluido estuvo en el tubo utilizando una pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo, el mismo procedimiento se realizó para cada uno de los tratamientos, sometiéndose a la centrifugación de acuerdo a los tratamientos: 600g x 20min, 600g x 30 min, 1000g x 20min o 1000g x 30 min.

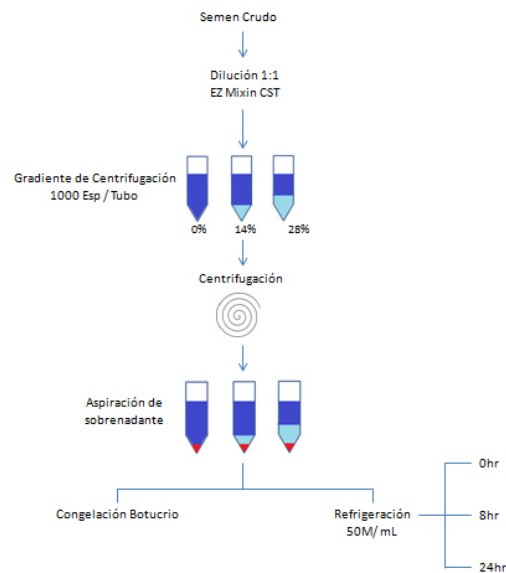


Figura 4. Representación esquemática del proceso del eyaculado usando la centrifugación coloidal y los tratamientos de centrifugación.

3.6. Refrigeración

Una vez terminado el proceso de centrifugación se re suspendieron las células espermáticas con un diluyente de refrigeración a una dilución de 50 millones de espermatozoides por 1 mililitro, la cual se almacenó en un contenedor para refrigeración (Equitainer, Hamilton, USA) el cual tiene un rango de enfriamiento de $-0.05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 4°C . Una vez almacenadas fueron evaluadas las variables de las motilidades consideradas (Total, progresiva, velocidad curvilínea, velocidad media de trayectoria y velocidad en línea recta), morfología y recuperación espermática para el experimento a las 0, 8 y 24 horas durante el proceso.

3.7. Congelación del semen

Posterior a la centrifugación fue retirado el sobrenadante en cada uno de los tubos usando pipetas Pasteur conectada a una bomba de succión a una presión de 300 mmHg y fue re-suspendido con el diluyente de congelación Botu-crio TM (Botupharma, Brasil); una vez que se agregó el diluyente de congelación se realizó el llenado de las pajillas utilizando un kit de llenado y sellado semi automatizado (Minitube, USA), sellándose con balines metálicos una vez empacado, se colocó en la cámara de congelación (CBS Freezer 2100 Series; Michigan, USA), con el siguiente esquema de congelación:

Etapa	Rango de Enfriamiento	Temperatura Deseada	Tiempo de la etapa
1	$2^{\circ}\text{C}/\text{min}$	22°C	-
2	$0.80^{\circ}\text{C}/\text{min}$	10°C	-
3	$0.40^{\circ}\text{C}/\text{min}$	4°C	5min
4	$60^{\circ}\text{C}/\text{min}$	-140°C	5min

Una vez finalizado el proceso de congelación, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido para finalmente colocarlas en un termo de almacenamiento.

3.8. Evaluación de la concentración espermática

La concentración espermática fue determinada con un fotómetro (SpermaCue, Minitube), para el conteo con semen crudo (recién colectado) y para la evaluación de la concentración de las pajillas una vez descongelada fue utilizada una cámara de Neubauer.

3.9. Análisis de Motilidad Espermática

Para la evaluación de la motilidad de cada etapa del experimento en el semen crudo o recién colectado se realizó una dilución a 50 millones/ml inmediatamente posterior a la colección, en la evaluación del proceso de refrigeración se obtuvo una muestra después del proceso de centrifugación y fue resuspendida a una dilución de 50 millones/ml mantenida durante las horas evaluadas en refrigeración, finalmente para la evaluación de las pajillas congeladas, el proceso de descongelación fue por medio de inmersión en baño maría a 37.5°C durante 1 min y resuspendida a una dilución de 50 millones/ml con diluyente de congelación.

La motilidad fue evaluada en un sistema de análisis computarizado (CASA) utilizando 10 tomas consecutivas, las imágenes obtenidas por cada campo fueron registradas utilizando un microscopio de luz de contraste de fases 20X (Olympus CX41) a través de un portaobjetos fijado a una altura de 20µm con cuatro cámaras (Leja Products, B. V., Nieuw-Venneps) y registradas por un software de análisis de movimiento (CEROS Hamilton Thorne Inc Thorne Biosciences). Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo (tiempo de captura de la imagen) a través de la laminilla y registrando los siguientes parámetros para el semen refrigerado: Motilidad Total (MT), Motilidad Progresiva (MP), para el semen descongelado se tomaron adicionalmente los valores de: Velocidad Curvilínea (VCL), Velocidad Media de Trayectoria (VAP), Velocidad en Línea Recta (VSL), Índice de linealidad (LIN), Rectitud del movimiento (STR) y Frecuencia de golpe cruzado (BCF).

El software utilizado Hamilton Thorne Ceros 12, fue configurado con las siguientes especificaciones:

Parámetro	Valor
Cuadros	40
Cuadros por segundo (Hz)	60
Contraste mínimo	74
Tamaño mínimo de célula (Pix)	4
Velocidad media de trayectoria (VAP- μ /s)	30.3
Rectitud (STR %)	50
Tamaño de célula (Pix)	5
Intensidad de célula	105
VAP –Límite de referencia (μ /s)	15

3.10. Morfología espermática

La morfología espermática fue evaluada por medio de un microscopio de luz de contraste de fases (Olympus BH-2, Olympus Optical., Ltd.). Se contaron y evaluaron 100 espermatozoides preservados en formalina con un pH balanceado, utilizando la técnica “Wet Mount” con un objetivo de 100X. Aquí se determinaron los porcentajes de células normales y las anomalías asociadas a: cabeza, cabeza suelta, parte media, gota proximal, gota distal, cola y células redondas.

3.11. Diseño experimental del estudio

Se formaron 4 tratamientos utilizando diferentes volúmenes de gradiente de concentración (0, 14 o 28%), con variación entre los tratamientos de gravedades y tiempos de centrifugación de la siguiente manera: 600g por 20 minutos, 600g por 30 minutos, 1000g por 20 minutos y 1000g por 30 minutos para los tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Todos los tratamientos fueron evaluados en motilidad, morfología y recuperación en proceso de enfriado a las 0, 8 y 24 horas y además fue evaluada la motilidad y morfología después de haber sido congelado.

3.12. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de un diseño completamente al azar para determinar las correlaciones entre las diferentes motilidades, volúmenes y tratamiento de centrifugación. Todos los datos fueron analizados usando el programa SPSS versión 18.0 (SPSS, INC., Chicago, IL)

La evaluación estadística de los diferentes volúmenes de gradiente de concentración (0, 14 o 28%), con variación de gravedades (600 o 1000g) y tiempos de centrifugación (20 o 30 minutos) fue por medio de un diseño factorial 3 x 2 x 2.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de parámetros de motilidad del semen refrigerado

Las medias y las desviaciones estándar de las motilidades total y progresiva del procesamiento durante la refrigeración para cada uno de los tratamientos están representadas en la tabla 1, donde se observa un aumento en los porcentajes para los tratamientos donde fue incluido el gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%, $P < 0.05$), incluso en las diferentes horas en refrigeración (0, 8 o 24h, $P < 0.05$).

Tabla 1. Motilidad total y progresiva ($\bar{x} \pm DE$) de acuerdo al volumen de gradiente (0, 14 y 28%) en cada tratamiento (T1: 600g x 20min; T2: 600g x 30min; T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min), y a la refrigeración a 5°C durante 0, 8 o 24h.

Tratamiento	Volumen/ Tiempo	n	Motilidad Total			Motilidad Progresiva		
			0%	14%	28%	0%	14%	28%
T1	0	6	54.5±11.3	73±6.1	70.8±6.8	67.3±9.6	83±6.6	79.33±6.4
	8	6	50.8±13.2	66±12.1	65.6±8.3	61.7±15.9	73.6±12.9	76±9.2
	24	6	43.5±8.7	54.3±11.8	60±8.1	57.5±8.8	69.8±10.9	71.6±7.6
T2	0	6	57.6±6.5	63.3±14.3	69.6±8.6	68.1±5.9	74.8±11.4	80.6±6.7
	8	6	49.1±6.3	65.6±6.3	68.1±8.3	61.7±7.2	75.5±8.1	78.6±6.9
	24	6	42±6.5	59±6.7	59±9	54.5±9.8	69.6±7.3	71.8±8
T3	0	6	44.5±13.1	55.8±10.8	59±9.4	55.6±14.8	69.1±12.8	72.8±10.6
	8	6	38.5±15.8	50.3±10.4	48.6±13.6	50.6±17.4	59.6±15.9	58.6±16.8
	24	6	30.17±13.1	43±12.9	42.8±11.5	41±19.1	55±16.9	56±16.6
T4	0	6	45±8.3	45±8.3	62±9.9	54.5±11.2	71.8±12.4	74.8±12.2
	8	6	39.3±8.8	55.8±12.7	58±14.9	52.6±12.1	65.6±15.8	58±17
	24	6	31.1±6	43.1±13	46.8±15.2	52±15,2	69.6±17.3	67.5±16.4

La tabla 2 presenta los promedios de las motilidades total y progresiva después del proceso de centrifugación para los cuatro tratamientos (T1: 600g x 20min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Las motilidades total y progresiva

obtenidas en los tratamientos T1 y T2 donde se usó menos tiempo y fuerza de centrifugación se obtuvieron promedios superiores (71 y 59%, 70 y 59% respectivamente; $P < 0.05$) comparados con los tratamientos de mayor tiempo y fuerza (57 y 45%, 60 y 49%, respectivamente).

Los promedios de las motilidades total y progresiva después del proceso de centrifugación utilizando diferentes volúmenes del gradiente (0, 14 o 28%) se presentan en la tabla 3. Los espermatozoides con mayores porcentajes de motilidad ($P < 0.05$) fueron para los tratamientos con gradiente de centrifugación (14 o 28%, 68 y 57%, 70 y 59%, respectivamente), sin embargo no existió diferencia ($P > 0.05$) entre los tratamientos con volúmenes de 14 o 28%.

Tabla 2. Motilidad total y progresiva ($\bar{x} \pm DE$) después de centrifugar de acuerdo al tratamiento (T1: 600g x 20min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tratamiento	Motilidad Total	Motilidad Progresiva
T1	71.06 ^a ± 12.2	59.85 ^a ± 13.1
T2	70.61 ^a ± 10.9	59.30 ^a ± 11.5
T3	57.63 ^b ± 17.1	45.87 ^b ± 14.2
T4	60.57 ^b ± 16.3	49.02 ^b ± 14.4

Tabla 3. Motilidad total y progresiva ($\bar{x} \pm DE$) después del proceso de centrifugación utilizando 0, 14 o 28% volumen de gradiente de centrifugación. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Volumen (%)	Motilidad Total	Motilidad Progresiva
0	55.60 ^b ± 14.0	43.86 ^b ± 12.5
14	68.63 ^a ± 14.2	57.44 ^a ± 13.3
28	70.68 ^a ± 13.3	59.22 ^a ± 13.1

La tabla 4, muestra los porcentajes de motilidad total y progresiva después del proceso de centrifugación de acuerdo al tiempo en refrigeración, donde se observa que durante las horas 0 y 8 (71 y 59%, 65 y 54%, respectivamente) los promedios son superiores y estadísticamente menores a las 24 h (58 y 46%, $P < 0.05$).

Tabla 4. Motilidad total y progresiva ($\bar{x}\pm DE$) de acuerdo al tiempo en refrigeración a 5°C durante las 0, 8 y 24h. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa.

Tiempo (h)	Motilidad Total	Motilidad Progresiva
0	71 \pm 12.9 ^a	59.6 \pm 12.6 ^a
8	65.3 \pm 15.4 ^a	54.6 \pm 14.4 ^a
24	58.5 \pm 15.5 ^b	46.2 \pm 13.8 ^b

4.2. Evaluación de parámetros de motilidad del semen congelado–descongelado

Los resultados obtenidos para el semen congelado-descongelado respecto a los parámetros de motilidad (Tabla 5) muestran que los valores de motilidad total y progresiva son superiores en los tratamientos T1 (33 y 27%), T2 (36 y 30%) y T4 (34 y 27%) comparados con el T3 (31 y 23%, respectivamente) ($P<0.05$), para la velocidad media de trayectoria (VAP) y para el índice de linealidad (LIN) fueron registradas velocidades superiores ($P<0.05$) para el T1 y T2 en comparación con los T3 y T4. Los resultados de velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), rectitud del movimiento (STR) y frecuencia de golpe cruzado (BCF) no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos.

Tabla 5. Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo los tipos de centrifugación (T1: 600g x 20 min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Tratamiento	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)
T1	33.0 \pm 1.3 ^a	27.1 \pm 1.2 ^a	108.2 \pm 1.9	41.9 \pm 3.6	53.0 \pm 9 ^a	39.3 \pm 6	77.5 \pm 8 ^a	21.5 \pm 9
T2	36.4 \pm 1.3 ^a	30.2 \pm 1.2 ^a	106.4 \pm 1.9	42.0 \pm 3.6	53.4 \pm 9 ^a	39.9 \pm 6	78.7 \pm 8 ^a	20.2 \pm 9
T3	31.0 \pm 1.3 ^b	23.9 \pm 1.2 ^b	106.2 \pm 1.9	46.1 \pm 3.6	51.1 \pm 9 ^b	37.9 \pm 6	74.5 \pm 8 ^b	21.5 \pm 9
T4	34.0 \pm 1.3 ^a	27.1 \pm 1.2 ^a	102.6 \pm 1.9	38.7 \pm 3.6	50.2 \pm 9 ^b	38.5 \pm 6	75.5 \pm 8 ^b	20.7 \pm 9

En la tabla 6 se detallan los resultados de las motilidades utilizando un volumen de 0, 14 o 28% del gradiente de centrifugación en el proceso, obteniendo valores superiores ($P < 0.05$) para los tratamientos en los cuales fue utilizado un volumen de gradiente del 14 o 28% comparado con el tratamiento del 0% de gradiente, para los demás valores de motilidad no existió una significancia ($P > 0.05$) respecto al uso del gradiente.

Tabla 6. Promedio ($\bar{x} \pm \text{DE}$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo a volúmenes del gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Volumen (%)	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)
0	24.8 \pm 1.1 ^b	20.0 \pm 1.0 ^b	51.7 \pm 8	40.5 \pm 3.1	105.8 \pm 1.6	39 \pm 6	76.4 \pm 7	20.5 \pm 8
14	38.0 \pm 1.1 ^a	30.6 \pm 1.0 ^a	52.3 \pm 8	45.7 \pm 3.1	107.0 \pm 1.6	38.9 \pm 5	76.9 \pm 6	20.9 \pm 8
28	38.0 \pm 1.1 ^a	30.6 \pm 1.0 ^a	51.8 \pm 8	40.3 \pm 3.1	104.8 \pm 1.6	38.8 \pm 5	76.3 \pm 6	21.4 \pm 7

Los resultados de motilidad (Tabla 7) obtenidos para el semen congelado-descongelado respecto al efecto del tiempo (0, 15 o 30 minutos) en general fueron similares ($P > 0.05$) para todas las motilidades del estudio en los tiempos 0 y 15 minutos después de descongelar el semen, sin embargo las motilidades total, progresiva, VCL y VAP se reducen a los 30 minutos ($P < 0.05$).

Tabla 7. Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de trayectoria (VAP), índice de linealidad (LIN), rectitud del movimiento (STR), frecuencia de golpe cruzado (BCF) del semen congelado-descongelado de acuerdo a los 0, 15 y 30 minutos después de la descongelación. Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Tiempo (min)	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	BCF (Hz)
0	35.34 \pm 1.1a	28.5 \pm 1.0a	53.8 \pm .8 ^a	41.3 \pm 3.1	108.4 \pm 1.6a	21.1 \pm .7	76.2 \pm .6	38.6 \pm .5
15	34.0 \pm 1.1a	27.5 \pm 1.0a	51.8 \pm .8b	40.6 \pm 3.1	107.0 \pm 1.6a	21.3 \pm .8	76.6 \pm .7	39.1 \pm .6
30	31.5 \pm 1.1b	25.1 \pm 1.0b	50.2 \pm .8b	44.7 \pm 3.1	102.2 \pm 1.6b	20.5 \pm .7	76.8 \pm .6	39 \pm .5

4.3. Evaluación de morfología del semen congelado–descongelado

Los porcentajes y características morfológicas específicas (CS: Cabezas sueltas, PM: Parte media, GP: Gota proximal, Gd: Gota distal, CR: Células redondas) analizadas para cada tipo de centrifugación se registran en la tabla 8. Los tratamientos T1 y T2 obtuvieron mayor porcentaje de células normales comparados con los centrifugados T3 y T4 ($P<0.05$). Los tratamientos T1 y T2 tuvieron menor cantidad de gotas proximales y distales, y el tratamiento T1 menor cantidad de defectos en la cola. En cuanto a porcentajes de cabezas sueltas el tratamiento T3 obtuvo valores menores, y los tratamientos T3 y T4 menor porcentaje de células redondas presentes ($P<0.05$).

Tabla 8. Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de las características morfológicas normales, cabezas sueltas (CS), parte media (PM), gota proximal (GP), gota distal (GD) y células redondas (CR) del semen congelado-descongelado para los diferentes tipos de centrifugación (T1: 600g x 20 min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Tratamiento	Normales (%)	Cabeza (%)	CS (%)	PM (%)	GP (%)	GD (%)	Cola (%)	CR (%)
T1	52.6±1.0 ^a	5.3±.3	2.2±.4 ^c	14.7±.8	1.0±.2 ^c	1.2±.3 ^c	24.5±.8 ^b	0.4±.1 ^a
T2	50.2±1.0 ^a	4.9±.3	3.0±.4 ^b	15.7±.8	1.0±.2 ^c	1.0±.3 ^c	27.8±.8 ^a	0.4±.1 ^a
T3	47.5±1.0 ^b	4.3±.3	1.9±.4 ^c	16.5±.8	1.7±.2 ^a	3.5±.3 ^a	27.3±.9 ^a	0.1±.1 ^b
T4	48.1±1.0 ^b	4.3±.3	3.7±.4 ^a	14.3±.8	1.3±.2 ^b	2.2±.3 ^b	26.4±.8 ^a	0.1±.1 ^b

Los resultados promedio de las características morfológicas normales, cabezas sueltas (CS), parte media (PM), gota proximal (GP), gota distal (GD) y células redondas (CR) del semen congelado-descongelado en relación al volumen del gradiente (0, 14 o 28%) utilizado. La tabla 9 muestra resultados superiores en el porcentaje de células normales y una reducción en el porcentaje de anomalías en cabeza, cabezas sueltas y células redondas para los tratamientos en los que se utilizó cualquier volumen del gradiente de centrifugación ($P<0.05$) y específicamente el uso del volumen del 14% resulta en un menor porcentaje de gotas proximales presentes ($P<0.05$).

Tabla 9. Promedio ($\bar{x}\pm DE$) de las características morfológicas normales, cabezas sueltas (CS), parte media (PM), gota proximal (GP), gota distal (GD) y células redondas (CR) del semen congelado-descongelado con diferentes volúmenes del gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Volumen (%)	Normales (%)	Cabeza (%)	CS (%)	PM (%)	GP (%)	GD (%)	Cola (%)	CR (%)
0	45.4±.9 ^b	5.8±.2 ^a	3.5±.3 ^a	16±.7	2±.1 ^a	2±.2	27.2±.7	0.7±0 ^a
14	51.1±.9 ^a	4±.2 ^b	1.8±.3 ^b	14.5±.7	0.5±.1 ^b	1.9±.2	26.6±.7	0±0 ^b
28	52.4±.9 ^a	4.3±.2 ^b	2.8±.3 ^b	15.4±.7	1.2±.1 ^a	2±.2	25.8±.7	0.1±0 ^b

4.4. Evaluación de la recuperación del semen congelado–descongelado

Los porcentajes de recuperación se presentan en las tablas 10 y 11, donde se observa que el tipo de centrifugado T4 (69.8±1.4) obtiene porcentajes mayores. De acuerdo al volumen del gradiente independientemente del porcentaje de gradiente utilizado (14 o 28%) se obtiene un promedio del 55% de recuperación sin existir diferencia significativa

entre ellos ($P>0.05$), sin embargo los tratamientos sin gradiente resultan en un porcentaje de recuperación superior (76.1 ± 1.2 , $P<0.05$).

Tabla 10. Porcentaje de recuperación de espermatozoides ($\bar{x} \pm DE$) para cada uno de los tipos de centrifugado (T1: 600g x 20 min, T2: 600g x 30min, T3: 1000g x 20min y T4: 1000g x 30min). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Tratamiento	Recuperación (%)
T1	61.8 ± 1.4^b
T2	58.7 ± 1.4^b
T3	59.1 ± 1.4^b
T4	69.8 ± 1.4^a

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de espermatozoides ($\bar{x}\pm DE$) de acuerdo al volumen de gradiente de centrifugación (0, 14 o 28%). Diferentes superíndices indican una diferencia significativa ($P<0.05$).

Volumen (%)	Recuperación (%)
0	76.1 ± 1.2^a
14	55.3 ± 1.2^b
28	55.6 ± 1.2^b

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de diversas técnicas de reproducción asistida ha permitido incrementar la calidad de eyaculados que se encuentran por debajo del estándar de calidad (Henk y Schill, 2003); una de estas técnicas son los gradientes de centrifugación que han incrementado valores de la calidad en semen fresco, refrigerado y después del proceso de congelación (Morrell *et al.*, 2008 y 2009; Brum *et al.*, 2008; Johannisson *et al.*, 2009; Ponthier *et al.*, 2013).

En este estudio el gradiente de centrifugación fue adicionado como parte del protocolo de criopreservación y de refrigeración, usando un mayor volumen de centrifugación, diferentes porcentajes del gradiente y gravedades en la centrifugación con el objetivo de mantener o incrementar las variables de la evaluación espermática, de manera que se simplifique el uso de la centrifugación con gradientes, mientras se maximiza la recuperación y se promueve la selección espermática.

Durante el protocolo de refrigeración después de la centrifugación coloidal, los valores de motilidad total y motilidad progresiva para los tratamientos en los que se usó el gradiente (solo una capa) fueron superiores comparados con el tratamiento testigo (sin gradiente) coincidiendo con los reportes anteriores para las diferentes formulaciones de gradientes (Johannisson *et al.*, 2009; Macías García *et al.*, 2009) y en específico para el uso del Equipure (Macpherson *et al.*, 2002; Love *et al.*, 2014). En el presente trabajo los porcentajes de gradiente utilizados fueron del 14 o 28% y no existió diferencia significativa en el aumento de las motilidades entre ambos, pero si hubo diferencia significativa con el tratamiento testigo (0%), resultados comparables a los de Macpherson *et al.* (2002), Johanson *et al.* (2009), Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2011) y Sabatini *et al.* (2014), donde utilizan volúmenes de 40-80%, 72%, 50% y 37%, respectivamente del volumen total con incrementos en la motilidad. También se evaluó el incremento de las motilidades durante el proceso de refrigeración, en donde se observa que logra mantenerse este incremento durante las 24 h con respecto al tratamiento testigo, con una tendencia para todos los tratamientos en reducir su motilidad, sin embargo, las motilidades para los tratamientos con el gradiente continuaron superiores a los del tratamiento testigo, similar a lo observado por Ayuso-

Hernando *et al.* (2012), Ramires-Neto *et al.* (2012) y Love *et al.* (2014) a las 0 y 24 h, no se reportan estudios evaluando a las 8 horas de refrigeración. En este estudio se tomó en cuenta y se observó que durante la curva de enfriamiento es constante el mantenimiento de las motilidades. Respecto al tiempo y la cantidad de gravedades utilizadas se observó que el aumento en la cantidad de gravedades (1000g) tiene un efecto detrimental sobre el porcentaje de motilidades obtenidas. Es por eso que posiblemente la mayoría de los estudios antes mencionados utilizan de 300-600 g por 15-20 minutos.

La criopreservación espermática es parte integral de los programas de reproducción asistida, sin embargo este proceso induce una serie de cambios que ocasionan daños graves en las células sobrevivientes o muerte celular (Watson, 2000), dependiendo de la capacidad de los espermatozoides para su procesamiento en congelación de acuerdo a la variación individual de cada semental. Por lo tanto, se han buscado métodos que logren obtener mejores calidades en el proceso de congelación. En este estudio se evaluó la inclusión del gradiente al proceso de criopreservación, en cuanto al análisis de motilidad total y progresiva de criopreservación los resultados de la descongelación fueron superiores, aunque no existió significancia en los demás valores de cinética espermática (VAP, VSL, VCL, STR; BCF; LIN) para los tratamientos 14 y 28%, pero en el caso de los tipos de centrifugación se obtuvieron resultados superiores en los T1 y T2. El STR ha sido descrito anteriormente solamente como una medida de progresividad (Cancel *et al.*, 2000), y ambas han sido tomadas como un parámetro para evaluar el potencial fértil del semental (Thys *et al.*, 1998), los estudios realizados en asociación con la fertilidad muestran una baja correlación entre las variables de cinética espermática (Katila, 2001; Kuisma *et al.*, 2006). En la evaluación morfológica se obtuvo un mayor porcentaje de células normales y una reducción en anormalidades asociadas a cabeza, cabezas sueltas y células redondas comparados con los tratamientos congelados sin el gradiente, razón por la cual pudiera existir una diferencia con la recuperación como se sugiere más adelante. Actualmente no existe un estudio que evalué la morfología después de la congelación incluyendo el gradiente, sin embargo en el presente estudio se observó diferencia en la morfología espermática entre tratamientos con o sin gradiente, por lo que se puede inferir que el aumento en el

porcentaje de células morfológicamente normales después de la centrifugación e incluso después de la descongelación es debida a la selección espermática del gradiente.

En la recuperación de acuerdo al porcentaje del gradiente se obtuvo $55 \pm 1.2\%$ de células para ambos volúmenes de gradientes (14 o 28%). Estos porcentajes de recuperación resultan ligeramente superiores comparado con un estudio usando un gradiente de diferente marca comercial (Androcoll-E), con menor volumen de centrifugación (15ml) con 50% de gradiente de centrifugación (Hoogewijs *et al.*, 2011), dado que en el presente estudio uno de los propósitos fue mejorar los porcentajes de recuperación adicionalmente se incrementó la cantidad de gravedades y el tiempo de centrifugación, y se encontró que independientemente del aumento de las gravedades la recuperación fue muy similar entre los tratamientos, pero se observó una reducción significativa en el porcentaje de motilidades en los tratamientos de 1000g, contrario a lo observado por los estudios de Ferrer *et al.* (2012) y Hoogewijs *et al.* (2010), quienes aumentaron la cantidad de gravedades obteniendo mayor porcentaje de recuperación y motilidades, sin embargo, estos estudios utilizaron un menor tiempo de centrifugación y fueron sin el uso de gradiente de centrifugación. No existe una explicación de los protocolos utilizados en cuanto al tiempo utilizado en la centrifugación con el gradiente, pero en todos los casos es superior a los 20 minutos, quizás se deba al tiempo necesario en que le tomara a la fracción espermática pasar las fases del gradiente. En futuras investigaciones se podría explorar utilizar gravedades altas con una tiempo reducido de centrifugación y evaluar los efecto en la calidad de la muestras.

Los resultados en cuanto a la recuperación sugieren que la selección antes de la criopreservación resulta en un incremento en general de la calidad del semen descongelado debido al retiro de los espermatozoides dañados, morfológicamente anormales y células no seminales que son potencialmente generadores de radicales libres de oxígeno y que se asocian a efectos dañinos en los espermatozoides normales (Ball *et al.*, 2001; Baumber *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010; Ponthier *et al.*, 2013), adicionalmente incrementa significativamente la probabilidad de que las pajillas sean aceptadas para su uso comercial en programas reproductivos con motilidades progresivas $\geq 30\%$ (Loomis, 2001), una de las desventajas encontradas en ambos

trabajos es la baja recuperación, cabe mencionar que uno de los protocolos ha sido implementado en el laboratorio en sementales clasificados como “no satisfactorios” para el proceso de congelación, logrando obtener pajillas de buena calidad.

6. CONCLUSIONES

La centrifugación del semen equino durante el proceso de enfriamiento o congelación es necesaria para eliminar líquido seminal. La inclusión de 14 o 28% de gradiente de centrifugación incrementó la calidad seminal y la resistencia cuando el semen se refrigera a 5°C, además la inclusión del gradiente al proceso de congelación permite preseleccionar a los espermatozoides y los resultados mostraron un incremento en la calidad del semen descongelado. Dado los resultados obtenidos, el uso de este gradiente de centrifugación bajo las condiciones de este estudio, podría ser un punto de oportunidad para sementales subfértiles o “no satisfactorios para la congelación de semen”. Considerando, que lo anterior, abre un precedente para estudios de asociación entre el gradiente, los porcentajes de fertilidad y el uso comercial del semen procesado bajo esta técnica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Amann R and B. Pickett. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *E Vet Sci* 7:145-173.

McKinnon A., Squires EL., Vaala W.E. and D.D. Varner, 2011. *Equine Reproduction* 2nd Edition. Wiley-Blackwell Vol 1: 867-877.

Ball B.A. Vo A.T., Baumber J. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62: 508-515.

Ball B.A. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science.* 257-267.

Ball B.A., Brum AM and K. Sabeur. 2008. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation.

Baumber J., Vo A., Sbeur K and B.A. Ball. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 57:1025-1033.

Baumber-Skaife J. 2011. Evaluation of Semen. Pages 1278–1291 in *Equine Reproduction*. 2nd ed. A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala, and D.D. Varner, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA.

Borgan, P., Beitsma, M., Henning, H., Gadella, B. and TSyout. 2015. Liquid storage of equine semen. Assessing the effect of D-penicillamine on longevity of ejaculated and epidymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.011>.

Brito L. F.C., Greene L.M., Kelleman A., Knobbe M. and R. Turner. 2011. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology.* 745-750.

Brito, L. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clin Tech Equine Pract* 6:249-26.

Cortés-Gutiérrez E., Crespo F., Serres-Dalman C., Gutiérrez de las Rozas A., Dávila-Rodríguez M., López-Fernández C. and J. Gosálvez. 2009. Assesment of sperm DNA fragmentation in stallion (*equus caballus*) and donkey (*equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. *Reprod dom anim.* 44:823-828.

Dorado, Alcaraz, M.J., Gálvez, Acha D., Ortiz, M., Urbano and Hidalgo. 2013. Single Layer centrifugation through Pure Sperm 80 selects improved quality spermatozoa from frozen thawed dog semen. *Animal Reproduction Science.* 232-240.

Eddy E. and D. O'Brien. 1994. The Spermatozoon. In: Neill EKEaJ. *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, Second ed. New York: Raven Press. 29-77.

Edmond A.J., S.R. Teague, S.P. Brinsko, K.L. Comerford, J.A. Waite, S.S. Mancill, C.C. Love and D.D. Varner. 2008. Effect of density-gradient centrifugation on quality and recovery rate of equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 107: 318.

Edmond AJ., Brinsko SP., Love CC., CLanchard TL., Teasgue SR. and D. Varner. 2012. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology.* 77: 959-966.

Fatehi A., Bevers M., Schoevers E., Roelen B. A. J., Colenbrander B and M. Gadella. 2006. DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. *Journal of Andrology.* Vol. 27, No. 2.

Freitas-Dell Aqua,C., Monteiro G., Dell'Aqua J. and F. Papa. 2013. The Effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science.* 33; 27-30.

Graham J. K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science.* 68:239-247.

Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A., Crespo F., Ramírez M.A., Gosálvez J. and C. Serres. 2012. The effect of two precryopreservation single layer coloidal centrifugation

protocols in combination with different freezing extender son the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. 54:72.

Gutiérrez-Cepeda L., Fernández A., Crespo F., Gosálvez J. and C. Serres. 2011. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science*. 124:85-89.

Henk, R.R, and W. B. Schill, 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:108-130.

Hoogewijs MK, Vliegheer SP De, Govaere JL, Schauwer de C, Kruif De A. and V. Soom. 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Veterinary Journal*. 44:542-549.

Johannisson A., Moreell J., Thorén J., Jönsson M., Dalin A. and Rodriguez-Martinez. 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*. 116:119-128.

Katila. 2001. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review *Acta Vet Scand.* 42(2): 199–217.

Kim S.H., Yu D.H. and Y.J. Kim. 2010. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 119:106-114.

Kuisma P., Andersson M., Koskinen E., Katila T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Act Vet Scand.* 48(1): 14.

Ley, W.B., W.A. Digraessie, G.R. Holyoak, and S.H. Slusher. 2002. Semen Quality in *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. 2nd ed. Mosby, St. Louis, MO. Pp. 187–199.

Lodish L, Baltimore D, Berk A, Zipursky L, Matsudaria P. and J. Darnell. 1995. Membrane structure: the plasma membrane. In: *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. New York: Scientific American Books, Inc.; 595-629.

- Loomis P.R.**, 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68:191-200.
- Loomis P.**, 2006. Advanced methods for handling and preparations stallion semen, *Vet Clin Equince.* 22:663-676.
- Loomis, P.R. and J.K. Graham.** 2008. Commercial frezin: individual male variation in cryosurvival and the responseof stallion sperm customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 105:119-128.
- López-Fernández C., Crespo F., Arroyo F., Fernández J.L., Arana P., Johnston S.D. and Gosálvez.** 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology.* 68:1240-1250.
- Love, Blanchard T., Varner D., Brinsko J., Voge J., Bliss, K., Sudderth, K., Teague, S. and K. LaCaze.** 2012. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on longevity of equine sperm quality following cooled storage, *Theriogenology* 77:1911-1917.
- Love C., Merlo B., Rizzato G., Mislei B., Castagnetti C. and G. Mari.** 2014. Recovery rate and sperm quality after centrifugation of stallion sperm in different gradient concentrations. *Journal of Equine Veterinary Science.* 34:63.
- Macías García, Morrell J.M., Ortega-Ferrusola C., González-Fernández L., Tapia J.A., Rodríguez-Martínez H. and F.J. Peña.** 2009. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal reproduction Science.* 114:193-202.
- Macpherson M.L., Blanchard T.L., Love C.C., Brinsko S.P. and D.D. Varner.** 2002. Use of silane coated silice particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology.* 58:317-320.
- Maziero R., Guasti P., Monteiro A., Avanzi B., Hartwig F., Lisboa F., Martinl and F. Papa.** 2013. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *Journal of Equine Veterinary Science.* 33:165-168.

Manafi Milad. 2011. Artificial Insemination in Farm Animals. Milad Manafi, ISBN 978-953-307-312-5. Publisher: InTech: 10.5772/713.

Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E.G., Delláqua Jr. and F.S. Zahan. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. Anim Reprod Sci. 293-301.

Pickett BW., Amann RP., McKinnon., Squires and J.L. Voss. 1989. Management of the stallion for Maximum Reproductive Efficiency, II. Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 05. Fort Collins: Colorado State University.

Pérez- Sánchez, F., Cooper, T.G., Yeung, C.H. and E. Nieschlag. 1994. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing Int. J. Androl 17:115-120.

Ponthier J., Teague S., Franck T., Rebiere G., Serteyn D., Brinsko S., Love C., Blanchard T., Verner D. and S. Deleuze. 2013. Effect of non-sperm cells removal with single layer colloidal centrifugation on myeloperoxidase concentration in post-thaw equine semen. Theriogenology. 30:1082-1087.

Ramires-Neto C., Monteiro G.A., Sancler-Silva Y.F.R., Papa P., Guasti P.N., Resende H.L., Papa J.A., Dell'aqua Jr. and M.A. Alvarenga. 2004. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation for stallions with poor and good semen freezability. Journal of Equine Veterinary Science. 58-60.

Ramires-Neto C., Monteiro G., Hartwing F., Papa F. and M. Alvarenga. 2012. Effect of different methods for sperm selection on cooled stallion semen. Abstracts ISSR 6th. Journal of Equine Vet Science 32:475-518.

Roser J.F. 2008. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine system.. Animal Reproduction Science. 179-196.

Sabatini C., Perrin A., Varner D., Clanchard T., Rota A. and C.C. Love. 2014. Effect of density gradient centrifugation with three different media on stallion semen quality. Journal of Equine Veterinary Science. 34:77.

Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod. Sci.* 60-61:481-492.