

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos”

Tesis previa a la obtención del
Título de Médico Veterinario y
Zootecnia.

Autores:

Erika Fabiola Tamay Siguenza. CI: 0302297833

Frixon Augusto Vélez Sandoval. CI: 0803452218

Director:

Dr. Manuel Elías Soria Parra Mg. Sc. CI: :1801620186

Cuenca – Ecuador

2018



Resumen

Se planteó como objetivo de esta investigación evaluar el efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos. Se utilizaron tres caballos de la raza Appaloosa de tres fincas ubicadas en la parroquia Victoria del Portete del cantón Cuenca, Provincia del Azuay. Las colectas de semen se realizaron dos veces por semana con la ayuda de una vagina artificial hasta alcanzar cinco eyaculados por animal. Se consideraron como variables independientes el tratamiento, el semental y la repetición, y como variables dependientes, la motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos/muertos, con anomalías, con la membrana plasmática y acrosomal intacta, que experimentaron estrés oxidativo y de ovocitos bovinos fecundados por espermatozoides equinos. Los datos se procesaron mediante el análisis de varianza del programa estadístico SAS. La evaluación post descongelación indicó que el semen diluido sin melatonina tuvo un porcentaje de espermatozoides vivos superior ($85,1 \pm 1,7$ vs $80,0 \pm 1,7$ %) y menos espermios con la membrana plasmática intacta ($25,2 \pm 1,8$ vs $31,3 \pm 1,8$ % respectivamente) que con melatonina ($P < 0.05$). La proporción de espermios sin estrés oxidativo y con estrés leve o moderado no varió entre tratamientos. En relación a la fecundación in vitro heteróloga se comprobó que no hubo diferencia entre tratamientos en los porcentajes de unión, penetración, poliespermia y pronúcleos a la 18 y 24 horas. Sin embargo, un mayor porcentaje de unión, de pronúcleos a la 18 y 24 horas y de clivaje se observó en la FIV homóloga que en la heteróloga.

Palabras clave: EQUINOS, ESPERMATOZOIDEOS, CRIOPRESERVACIÓN, MELATONINA, ESTRÉS OXIDATIVO, FECUNDACIÓN HETERÓLOGA.



Abstract

The objective of this research was to evaluate the effect of melatonin in the cryopreservation of equine spermatozoa. Three Appaloosa horses from farms located in the Victoria del Portete parish, Azuay Province, were used. Semen samples were collected twice a week, with an artificial vagina, until five ejaculates per animal were complete. Treatment, stallion and repetition were considered as independent variables, whereas as dependent variables were studied the individual progressive motility, the percentages of spermatozoa live/dead, with abnormalities, with the intact plasma and acrosomal membrane, undergoing oxidative stress, bovine oocytes fertilized by equine sperm. Data were processed by the analysis of variance of SAS. The post-thaw evaluation indicated that the semen diluted without melatonin had a greater percentage of live sperm (85.1 ± 1.7 vs $80.0 \pm 1.7\%$) and less sperms with the intact plasma membrane (25.2 ± 1.8 vs $31.3 \pm 1.8\%$ respectively) than with melatonin ($P < 0.05$). The proportion of sperm without oxidative stress and with slight or moderate stress were statistically similar between treatments. Regarding to heterologous in vitro fertilization (IVF), it was found that there was no difference between treatments in the percentages of union, penetration, polyspermia and pronuclei by 18 and 24 hours. However, a greater percentages of union, of pronuclei by 18 and 24 hours and of cleavage was observed in the homologous than in the heterologous IVF.

Keywords: HORSES, SPERM, CRYOPRESERVATION, MELATONIN, OXIDATIVE STRESS, HETEROLOGOUS FERTILIZATION



ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Objetivos	16
1.1.1. General.....	16
1.1.2. Específicos	16
1.2. Hipótesis	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1. Semen Equino	17
2.1.1. Características del semen.....	17
2.1.2. Método de recolección del semen.....	17
2.2. Vagina artificial	18
2.3. Recolección y transporte de semen.....	19
2.4. Dilución y conservación del esperma fresco.....	20
2.5. Características Macroscópicas.....	20
2.5.1. Volumen seminal.....	20
2.5.2. Aspecto	21
2.5.3. pH.....	21
2.6. Características Microscópicas.....	21
2.6.1. Características morfológicas	21
2.6.2. Motilidad espermática	22
2.6.3. Concentración espermática.....	22
2.6.4. Cambios en la integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal	23
2.7. Melatonina.....	23
2.7.1. Estudios realizados con melatonina.....	26
2.8. Estrés Oxidativo	27
2.9. Fecundación in Vitro.....	31
3. Materiales y Métodos.....	34
3.1. Materiales.....	34
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Área de estudio.....	35
3.2.2. Metodología para la investigación experimental.....	36
3.2.3. Variables de estudio y diseño Experimental	42
4.1. Operacionalización de las variables.....	43
4. RESULTADOS	44



4.1. Semen fresco	44
4.2. Semen descongelado por tratamiento	45
4.3. Niveles de estrés oxidativo por tratamiento	46
4.4. Fecundación Heteróloga.....	46
5. DISCUSION	48
6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA.....	56
8. ANEXOS.....	62



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Parámetros del semen fresco de acuerdo a cada semental	44
Tabla 2: Parámetros seminales obtenidos de muestras descongeladas por tratamiento	45
Tabla 3: Niveles de estrés oxidativo por tratamiento en semen descongelado con o sin melatonina	46
Tabla 4: Fecundación heteróloga en ovocitos bovinos con espermatozoides equinos criopreservados con y sin melatonina.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICO

Ilustración 1: Vagina artificial tipo Hanover.....	19
Ilustración 2: Ubicación de la granja de Irquis	35
Ilustración 3: Proceso de tinción de los presuntos cigotos	41
Ilustración 4: Fijación de muestras al portaobjetos.....	42



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Frixon Augusto Vélez Sandoval en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 12 de septiembre del 2018

A handwritten signature in blue ink, reading "Frixon Augusto Vélez Sandoval", written over a horizontal line.

Frixon Augusto Vélez Sandoval

C.I: 0803452218



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Erika Fabiola Tamay Siguenza en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 12 de septiembre del 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and strokes, positioned above a horizontal line.

Erika Fabiola Tamay Siguenza

C.I: 0302297833



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Frixon Augusto Vélez Sandoval, autor del trabajo de titulación "Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 12 de septiembre del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Frixon Augusto Vélez Sandoval", written over a horizontal line.

Frixon Augusto Vélez Sandoval

C.I: 0803452218



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Erika Fabiola Tamay Siguenza, autor del trabajo de titulación “Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de septiembre del 2018

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Erika Fabiola Tamay Siguenza

C.I: 0302297833



Agradecimiento

Hacemos extensivo nuestro agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han aportado con sus conocimientos y destrezas a sacar adelante nuestro proyecto de investigación, sin duda alguna cada etapa de esta investigación ha requerido esfuerzo, constancia y apoyo, es por ello que queremos agradecer de manera especial a nuestro tutor de tesis Dr. Manuel Soria quien nos ha apoyado durante todo este proceso con su capacidad y experiencia. También nuestro agradecimiento sincero hacia el Dr. Fernando Perea PhD, por su apoyo desinteresado al aportarnos su guía y conocimientos, así mismo al Dr. Daniel Argudo encargado del laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, quien nos ha dado la apertura necesaria para llevar a cabo todo el proceso investigativo, además de impartirnos sus conocimientos acertados para efectuar de manera eficaz los objetivos propuestos.

Sin duda alguna, para llegar a esta meta final, cada enseñanza adquirida durante varios años impartidos por los maestros que laboran en nuestra Facultad nos han ayudado para desarrollar de la mejor forma nuestro proyecto de investigación, la labor cumplida por cada uno de ustedes se ve reflejado en los logros alcanzados por sus estudiantes.



Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a todas aquellas personas, quienes con sus consejos y ánimos han logrado desarrollar en mi un espíritu de superación y constancia.

Agradezco a Dios por haber guiado mis pasos durante toda mi vida , a mi padre Bolívar Tamay , por ser el pilar fundamental en mi vida gracias a su ejemplo de valentía y perseverancia por alcanzar todo cuanto uno anhela en la vida, a mi esposo Andrés Aguirre quien me ha acompañado a lo largo de este camino con abnegación, paciencia y cariño hasta culminar esta meta trazada, a mis hermanos Johanna, Israel, Dennis y Keyllin , a mi tía Julita y Luisa quienes han llegado a ser muy queridas por mí y han sabido llenar y cumplir el papel de mi madre por circunstancias de la vida , a mis abuelos, suegros y demás familiares, a todos y cada uno mil gracias. Finalmente, y no menos importante a los docentes de la Universidad, sus enseñanzas académicas y enseñanzas de vida junto con su amistad las llevaré siempre en mi memoria.

Erika Fabiola Tamay Siguenza

Dedico mi trabajo de titulación principalmente a mi familia y con especial énfasis a mis padres, quienes fueron motivo e inspiración para lograr esta meta, así como al apoyo incondicional de mi novia. También a los docentes que conforman la escuela de Medicina Veterinaria que con su incesable labor me brindaron todo el conocimiento adquirido e indispensable para formarme como un profesional con valores y ética.

Frixon Augusto Vélez Sandoval



Abreviatura y simbología

ROS: Especies reactivas de oxígeno

COC's: Complejo cúmulo ovocitos

FIV: Fertilización in vitro

MIV: Maduración in vitro

µm: Microlitro

HOST: Test hiposmótico.

VA: Vagina artificial

mM: Micro molar

ZP: Zona pelúcida

Pn: Pronúcleos

H – SOF: Hepes – Fluido oviductal sintético

MIP: Motilidad individual progresiva



1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen equino ha tenido un importante desarrollo dentro de las biotecnologías de la reproducción, sin embargo, no ha resultado tan eficaz como en otros mamíferos, existe una gran variabilidad en la tasa de éxito de este procedimiento, siendo incluso de carácter individual. Se estima que solo del 30 – 40 % de los caballos producen semen que puede criopreservarse y a su vez conservar su capacidad fecundante en niveles aceptables (1).

En el proceso de congelación de semen, el espermatozoide sufre estrés oxidativo debido al shock térmico al que es sometido, afectando a parámetros importantes como la motilidad y capacidad fecundante. La resistencia a este proceso depende fundamentalmente de la integridad estructural y funcional de su membrana celular, que a su vez está relacionada a la estabilidad de sus lípidos (2). Con el objetivo de reducir los efectos negativos del proceso de congelación, se han incorporado agentes antioxidantes a los diluyentes de semen equino (3).

La melatonina funciona como un antioxidante versátil (4), por su naturaleza lipofílica, logra interactuar con las bicapas lipídicas, estabiliza las membranas internas mitocondriales y mejora la actividad de la cadena de transporte de electrones (5). Varios proyectos de investigación, han determinado que la adición de melatonina al medio de congelación protege a los espermatozoides del estrés oxidativo, preservando sus capacidades post descongelación (4),

Por lo tanto el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la melatonina sobre la criopreservación de espermatozoides equinos, siguiendo el lineamiento tomado de un artículo cuyo tema fue “ Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic – like changes in stallion spermatozoa”, en el que se agregó melatonina al eyaculado del semental a razón de 1 μ M (6). Para estimar la calidad seminal tanto de forma subjetiva como objetiva, se usaron varios parámetros de evaluación como:



vitalidad, motilidad, integridad acrosomal, integridad de membrana y ROS; a estos parámetros de evaluación se le agrega la fecundación in vitro heteróloga, misma que permite determinar la capacidad fecundante del seminal, ésta última evaluación inter especie ha sido de mucha utilidad, dando resultados muy cercanos a la realidad, según describe Sánchez et al, (7).



1.1. Objetivos

1.1.1. General

Determinar el efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos.

1.1.2. Específicos

- Valorar las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides equinos criopreservados en presencia de melatonina.
- Medir la capacidad de la melatonina para prevenir el estrés oxidativo que ocurre durante la criopreservación de los espermatozoides equinos.
- Evaluar el efecto de la melatonina sobre la fecundación in vitro heteróloga de espermatozoides equinos luego de la criopreservación.

1.2. Hipótesis

La adición de melatonina antes de la criopreservación de semen equino previene el estrés oxidativo, el deterioro de la calidad espermática y la pérdida de la capacidad fecundante.



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Semen Equino

Se ha considerado que la muerte del esperma y las modificaciones que sufren las células, son los principales factores que provocan una considerable reducción de la vida útil de los espermatozoides, en equinos principalmente se ha demostrado la susceptibilidad particular de la membrana plasmática del esperma frente al daño oxidativo debido a un alto contenido celular de ácidos grasos poliinsaturados (8).

2.1.1. Características del semen

El semen equino está compuesto por los espermatozoides y plasma seminal (9), éste último a su vez está compuesto por varias fracciones: La pre – secreción , esta eliminación es rica en NaCl y se produce en el salto o cuando el equino llega a tener una máxima excitación, esta pre- secreción tiene la finalidad de limpiar y lubricar la uretra (8).

Normalmente un semental realiza entre 5 – 10 golpes de eyaculación sucesivos, la tres primeras expulsiones son de consistencia lechosa y poseen hasta el 80% de espermatozoides totales, son ricos en ergotioneína (9), el mismo que cumple con el papel de antioxidante y capacidad citoprotectora, reduciendo a su vez la peroxidación lipídica (10) y proceden de las ampollas del conducto deferente (9).

Existe una fracción pobre o fracción gel, (8) poseen pocos espermatozoides y por su consistencia podemos decir que provienen de las vesículas seminales. (9) La última fracción o también denominada pos coito, posee escaso volumen y es de consistencia acuosa (8).

2.1.2. Método de recolección del semen

La recolección de semen se lleva a cabo con una vagina artificial (VA) existiendo varios tipos, cada una cumple la función de imitar las condiciones de temperatura y presión de la vagina de la yegua (7), es fundamental que durante la recolección del eyaculado, le proporcionemos al animal, un lugar



confortable , libre de polvo y el piso en donde estamos realizando el procedimiento sea antideslizante, para evitar caídas o golpes innecesarios, también se debe contar con un espacio considerable, en el que facilite el movimiento del equino , así como también de sus cuidadores (11).

2.2. Vagina artificial

La vagina artificial es un método eficaz que se utiliza para la recolección de semen, similar a recolección de una monta natural , la mayoría de los sementales que son utilizados para la recolección, dependiendo el procedimiento y manejo de operador aceptan este método sin que se altere su comportamiento sexual (12).

Entre las vaginas artificiales más usadas tenemos la Missouri, Hanover y Colorado, se debe conservar una temperatura entre 45 – 48°C (17). La elección de una de ellas dependerá del operador que vaya a realizar el procedimiento el mismo que buscará que la vagina artificial que eligió sea de fácil manejo, el peso adecuado y lo más adaptable al semental, lo cual determinará la eficacia del proceso (11).

- **Colorado**

Este tipo de vagina artificial, es relativamente más larga que los otros modelos y es más pesada, se llena de agua con facilidad (11), manteniendo la temperatura por más tiempo (13) y ejerce una presión mucho más uniforme a lo largo del pene (11).

- **Hanover**

Este modelo es más pequeña que la vagina artificial Colorado y su carcaza es de goma, la mayoría de los sementales se ajustan a este modelo y el eyaculado es recolectado cerca del saco o en el interior del mismo, es necesario tener en cuenta la presión que éste ejerce sobre el pene, debido a que durante la eyaculación el glande se ingurgita y al no haber el

suficiente espacio, puede llegar a causar molestias y ser doloroso para el animal (11).



Ilustración 1: Vagina artificial tipo Hanover

- **Missouri**

Este tipo de vagina artificial es posiblemente la más usada por su peso ligero y fácilmente adaptable al operador (12), consta básicamente de un cilindro exterior de caucho rígido, en el cual en su interior se encuentra un cilindro blando de paredes delgadas, una parte estrecha el cual se une al tubo recolector y la extremidad proximal está formado por un anillo que simula el esfínter uretral de la yegua (14), permitiendo una estimulación externa del glande y la base del pene del semental (12).

2.3. Recolección y transporte de semen

La recolección del semen puede ser exitosa dependiendo de la libido natural que caracteriza al semental, pero influirán factores como la genética del animal, factores ambientales e incluso la conducta del mismo. (11) Al inicio del proceso el operador deberá estar equipado con lo necesario, la yegua en celo o en su defecto un maniquí, la vagina artificial a una temperatura adecuada entre 42 – 44°C (8).

Se debe realizar el proceso de monta lo más parecido a una monta natural el operador debe colocarse de forma cuidadosa a un costado de la yegua a una distancia considerable y sujetar la vagina artificial con firmeza. Es necesario que se sujete con la mano izquierda la base del pene, para saber el momento en el que realiza el macho la eyaculación, el equino en esta fase empieza a



mover su cola de forma ondulatoria, lo cual también nos indica el proceso de eyaculación (8).

Una vez terminado el proceso, se debe retirar lentamente la vagina artificial, higienizar el pene del macho con agua tibia, luego secarlo y se procede a llevar el vaso colector al laboratorio, evitando los rayos solares directos y el ingreso de agua en el interior del vaso colector (8).

2.4. Dilución y conservación del espermatozoides fresco

Una vez colectado el semen, se debe evitar que la muestra se contamine y antes de efectuar la dilución, se debe retirar por medio de un proceso de filtrado la porción gelatinosa. Se puede usar el medio o compuesto químico de Berliner el mismo que contiene 5,70 g. de glucosa, 0,67 g. de tartrato sódico-potásico, 315,00 g. de yema de huevo fresco, 1.8 g. de gelatina y 100,00 g. de agua (14).

El diluyente INRA96, una sustancia líquida que tiene como función mantener la viabilidad espermática a 15°C durante más tiempo, es el que mejores resultados ha obtenido sobre todo en padrillos con espermatozoides sensibles al shock térmico. Su composición se basa en 0.1 g de CaCl_2 , 0.4 g de KCl , 0,06 g de KH_2PO_4 , 0.2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.25g de NaCl , 0.118g de NaHPO_4 -12 ml de H_2O , 0.35g de NaHCO_3 , 4.76g de HEPES, 13.21g de Glucosa, 45.39g de lactosa, c.s.p 100ml de agua destilada y 27g/l de fosfocaseinato natural. El diluyente antes de ser utilizado con el semen debe ser precalentado a 37°C y mezclarse en relación 1:1 (8).

2.5. Características Macroscópicas

2.5.1. Volumen seminal

Es fundamental tomar en cuenta el volumen seminal, junto con la concentración espermática, debido a que nos indican el número total de espermatozoides eyaculado por el semental. El volumen suele oscilar entre 50 – 75ml, pero en el mejor de los casos puede llegar hasta los 150 – 170 ml, dependiendo de la estación del año y el animal en cuestión (9)(15).



2.5.2. Aspecto

El aspecto es un punto muy importante dentro de la evaluación macroscópica del eyaculado, su coloración va desde un gris cenizo a blanco y la consistencia del eyaculado varía entre acuoso y lechoso; entonces cuanto más blanco lechoso sea, se podría decir que tiene mejor concentración espermática. La presencia o no, de orina y sangre, causaría efectos negativos en la muestra (8).

2.5.3. pH

El pH debe ser determinado inmediatamente después de la colecta debido a que mientras más avance el tiempo y la muestra esté en reposo, se generará la formación de ácido láctico, lo cual alterará los resultados de la muestra. El pH del eyaculado equino varía entre 6,2 – 7,8, este parámetro puede ser medido con la ayuda de un pHímetro o en su defecto las tiras reactivas (8).

2.6. Características Microscópicas

2.6.1. Características morfológicas

La evaluación de las características morfológicas nos ayuda a identificar espermatozoides normales de los anormales y se pueden usar métodos de tinción como el de eosina – nigrosina para evaluar vitalidad y la técnica de solución salina de formol tamponada con microscopía de fase de contraste que proporciona una resolución mejorada (15).

La evaluación de la morfología de los espermatozoides nos indica las distintas anomalías de cabezas y piezas intermedias, acrosomas anormales, presencia de gotitas proximal y distal, cabezas desprendidas, piezas intermedias y colas dobladas, colas en espiral y células germinales prematuras (15).

Las anomalías detectadas pueden indicarnos condiciones transitorias o de corta duración en el caso de acumulación de esperma, sobre todo en caballos que no han sido utilizados para la monta durante un largo tiempo, en el que se presentan colas en forma de orquilla, gotitas de cristales y cabezas anormales separadas. En otros casos las anomalías pueden deberse a disfunción



testicular cuando se observa colas en espiral, células germinales prematuras y cabezas y piezas intermedias anormales (15).

2.6.2. Motilidad espermática

La motilidad espermática es una de las pruebas más comunes para evaluar la calidad espermática (15) y su viabilidad (13). Biológicamente el espermatozoide cuenta con la capacidad de movilidad necesaria para la fertilidad y se basa principalmente en la evaluación de la motilidad total y la motilidad progresiva pero muchas veces este proceso normal se encuentra afectado por condicionantes externas que reducen la capacidad fértil de los mismos (15).

Al momento de la evaluación se debe proveer al esperma un medio controlado que no cause cambios drásticos a su normal funcionamiento y por ende nos den resultados equivocados. Para proceder con la visualización del semen en estudio se deben utilizar microscopía adecuada de contraste x20 y x40 objetivos, el aumento final debe ser de x200 y x400 respectivamente, el microscopio usado debe tener una temperatura ajustada a 37°C. (15)

La subjetividad del clínico que analiza la muestra se basa principalmente en la evaluación de dos tipos de motilidad, la motilidad total y la motilidad progresiva, este último se basa en analizar el movimiento que los espermatozoides proyectan, es decir la progresividad del esperma indica normalidad, mientras que aquellos que carecen de movilidad, se los considera defectuosos. (15)

2.6.3. Concentración espermática

Permite calcular el número total de espermatozoides contenidos en la muestra y para esto utiliza hemocitometría que permite tener una medida directa de la concentración de esperma (15). Esta concentración oscila entre 30 y 800 millones por mililitro de eyaculado, el número total de espermatozoides dependerá básicamente de tres factores : El mismo semental, la estación del año y la frecuencia de eyaculado (9).



2.6.4. Cambios en la integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal

Los procesos de conservación de semen entre ellos la congelación, pueden llegar a causar cambios negativos en su integridad estructural y funcional de membrana, resultando en parámetros bajos de vitalidad, viabilidad y motilidad espermática pos descongelación, para esto se usan dos pruebas como son el Test de endosmosis o hiposmótico (HOST) el Test de resistencia osmótica (ORT) (32).

El Test hiposmótico (HOST) se centra en la semipermeabilidad de la membrana plasmática intacta y bioquímicamente activa de los espermatozoides vivos, estos a su vez deberán absorber el agua al entrar en contacto con una solución hiposmótica con el fin de alcanzar un equilibrio osmótico provocando un aumento en el volumen de la célula lo que se reduce en un abultamiento de la membrana plasmática y acortamiento de la longitud del flagelo (32).

La aparición de un rizo en el flagelo indicará que el agua ha sido transportada hacia la célula para alcanzar el equilibrio antes mencionado (16) pero este proceso se dará únicamente en aquellos espermatozoides que contienen una membrana plasmática íntegra y sus mecanismos de intercambio de fluidos funcionando adecuadamente (17).

El test ORT o de resistencia osmótica valora la funcionalidad acrosomal en donde se somete a los espermatozoides a un medio hiposmótico en donde aquellos que estén funcionalmente activos no mostrarán alteraciones acrosómicas estructurales, el cuál de manera indirecta nos dice la capacidad de los espermatozoides de soportar la criopreservación (32).

2.7. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se sintetiza y se libera en la glándula pineal o epífisis principalmente, pero es apenas a partir del siglo XIX cuando se empieza a establecer a esta glándula con la función reproductiva y



es Bargman en 1943 quien descubre que esta posee función endocrina regulada por fotoreceptores a través del SNC (18).

La melatonina comienza cómo triptófano(19) que es convertido en 5 - hidroxitriptófano por triptófano-5- hidroxilasa que se transforma a 5-hidroxitriptamina por la enzima L-aminoácido aromático decarboxilasa que se transforma a 5-hidroxitriptamina por L-aminoácido aromático decarboxilasa que es catalizada por el hidroxil-O-metiltransferasa con el que se obtiene cómo producto final la melatonina (20).

La producción de melatonina está regulada por los ciclos de luz y oscuridad. Los pinealocitos son las células encargadas de producir melatonina a partir del triptófano que es se convierte en serotonina debido a las reacciones enzimáticas producidas y que en presencia de la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) es transformada a melatonina que viaja ligada a la albúmina (21).

La melatonina posee gran capacidad de acción al ingresar al espermatozoide gracias a su afinidad de carácter lipofílico y gracias a los receptores MT1 y MT2 que transportan la melatonina a otras organelas y al núcleo. Al ingresar captura y neutraliza especies reactivas de oxígeno libres (ROS) que se produjeron en exceso en el espermatozoide debido al estrés (22). También se ha encontrado un receptor de baja afinidad, MT3 que reaccionan junto con la melatonina cómo una enzima y un sustrato (23).

Se ha encontrado que la melatonina actúa en los espermatozoides ya que posee la capacidad de estimular o de inhibir su capacitación lo cual está directamente relacionado con la cantidad de melatonina adicionada en las muestras (24).

Se estudió a la melatonina en la que se buscó demostrar el efecto antioxidante de la misma en diferentes dosis (50pM, 100pM, 200pM y 1 μ M) sobre semen equino congelado con especial énfasis en la mitocondria espermática como mayor productor de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se encontró que la



melatonina fue capaz de aumentar el porcentaje de espermatozoides con mitocondrias activas cuando se incubó hasta 1 hora a 37°C con concentración de melatonina de 1 μM al alcanzar cerca del 60% de espermatozoides (24).

La melatonina se ha podido encontrar presente en el plasma seminal de carneros donde ejerce su acción antioxidante y que se relaciona íntimamente con parámetros como motilidad espermática. Además como se ha encontrado melatonina en el tracto genital femenino y que puede estar relacionado con la calidad espermática (24).

También se ha encontrado que la melatonina tiene gran importancia metabólica en la regulación del metabolismo celular como es la síntesis de lípidos, regulación de glucosa, neoformación de adipocitos y regulación del balance energético (25).

Tras varios estudios experimentales de comprobación cinética con una resonancia de electrones giratorios que posee la capacidad de capturar los radicales libres, se pudo determinar que a velocidad de interacción de la melatonina con el ión hidroxilo es de $0.6 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Así mismo se pudo comprobar que la melatonina posee una velocidad de interacción con el oxígeno de $2.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (19).

Se debe entender que la melatonina se produce en la glándula pineal, pero además es producida en otros órganos principalmente de mamíferos entre los que se pueden encontrar el tracto gastrointestinal que en cantidad su producción es más elevada que la glándula pineal y en el folículo ovárico que posee niveles exageradamente altos siendo mayores a los encontrados en el plasma sanguíneo (26).

Se ha probado un sin número de aditivos encaminados a mejorar la calidad espermática y entre estos podemos encontrar que las primeras en ser utilizadas son las vitaminas entre las que destacan ácido ascórbico, tocoferol, B-carotenos que pretenden mitigar los efectos nocivos de la superoxidación oxidativa actuando así como antioxidante (27).



2.7.1. Estudios realizados con melatonina

Se buscó demostrar en efecto de la melatonina sobre semen equino congelado y se probó el potencial antioxidante de la misma, quien describe que la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es la mitocondria que al ser sometida a cambios físicos, químicos o ambientales producen oxígeno en exceso que posteriormente afecta a la misma célula. Se encontró que la melatonina fue capaz de aumentar el porcentaje de espermatozoides de espermatozoides con mitocondrias activas cuando se incubó hasta 1 hora a 37°C con concentración de melatonina de 1 μ M al alcanzar cerca del 60% de espermatozoides. Estos se diferencian de las otras concentraciones y el control que se encontraron por debajo del 50% de espermatozoides con mitocondria activa, demostrando que la melatonina tuvo especial importancia a nivel mitocondrial. También se encontró cerca del 70% de espermatozoides vivos con la adición de 200ppm de melatonina, en relación al control sin melatonina que apenas alcanzaba un 20% (28).

Se probó el efecto de la melatonina en concentraciones de 0.1, 1, 2, 3 y 4 mM más el control de 0 mM de melatonina en espermatozoides bovinos. Al descongelarlos se pudo encontrar que la capacidad antioxidante total (TAC) fue más alta en muestras que contenían melatonina y fue la adición de 3mM que obtuvo el resultado más alto siendo 48.9 +- 2.7 μ M (22).

También se buscó demostrar el efecto antioxidante de la melatonina en diferentes dosis (50pM, 100pM, 200pM y 1 μ M) sobre semen equino congelado con especial énfasis en la mitocondria espermática como mayor productor de especies reactivas de oxígeno. Se encontró que la melatonina fue capaz de aumentar el porcentaje de espermatozoides de espermatozoides con mitocondrias activas cuando se incubó hasta 1 hora a 37°C con concentración de melatonina de 1 μ M al alcanzar cerca del 60% de motilidad espermática. (24)



2.8. Estrés Oxidativo

El oxígeno es necesario para la respiración celular en la que participa la mitocondria al generar energía a través del proceso de fosforilación oxidativa, pero un bajo porcentaje de este oxígeno no es aprovechado y se obtiene exceso de oxígeno libre que llega a ser perjudicial para la célula espermática hasta tal punto que puede producir apoptosis de la misma (19).

Del total de oxígeno disponible para la célula espermática, el 95% es captado por la mitocondria y el restante que queda libre es reducido químicamente al perder un protón de carga eléctrica positiva y transformándose en anión superóxido con carga eléctrica O^{-1} lo cual lo vuelve tóxico ($\bullet O$) e inestable por lo que intentará unirse con otras moléculas para estabilizarse químicamente (21).

El oxígeno reducido logra estabilizarse al unirse con otras moléculas y formar nuevos compuestos tóxicos. El oxígeno también puede conjugarse con moléculas de hidrogeno formando el peróxido de hidrógeno H_2O_2 mediante una vía enzimática a través de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 posee baja toxicidad, pero presenta una vida media relativamente larga con capacidad de producir mayor daño, a lo cual se suma el hecho de que puede atravesar membranas y llegar a sitios que son relativamente lejanos (19).

El H_2O_2 en el camino puede encontrarse con una molécula de hierro con la cual produce la reacción de frentón que transforma H_2O_2 en moléculas hidroxilo ($\bullet OH$) que produce alta toxicidad en la célula espermática de manera que se menciona que, del daño producido por las especies reactivas de oxígeno, el 50% es debido al radical hidroxilo (19).

El ión hidroxilo no posee predilección por ningún compartimento o áreas específicas de la célula, es decir que produce daño indiscriminado a su paso por toda la célula siendo afectados carbohidratos, lípidos de membrana y hasta cambios y destrucción en la cadena de ADN. A diferencia de los otros radicales, el $\bullet OH$ no puede ser desactivado por enzimas, sólo puede ser



neutralizada por secuestradores de radicales libres (29), (19).

El ión hidroxilo tiene una vida media de 10^{-9} segundos poco antes de que se encuentre con otras moléculas y forman nuevas reacciones. Además posee la capacidad de viajar a una media de pocos angstroms, hasta que se una con otras moléculas, de forma que ejerce su acción en sitios exactos y cercanos a su formación(19).

Todos estos radicales y aún más el $\bullet\text{OH}$ se adhieren a la membrana citoplasmática y producen destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados lo que repercute en cambios de fluidez de la membrana y alteración en la permeabilidad que permite la salida en demasía de cloruro y entrada del sodio, mientras que permite el paso de moléculas de calcio excesivamente y que alteran el pH intracelular colaborando a la destrucción de organelas y apoptosis (30).

Al alcanzar el núcleo, estos radicales producen alteración y consecuente daño en la cadena de ADN por lo que alteraciones de este tipo están íntimamente relacionadas con problemas de fertilidad que pueden variar resultados al realizar pruebas de fecundación in vitro (19).

La producción de ROS también puede ser cuantificado mediante espectrofotometría, la técnica (TBARs) en la que se produce una reacción que añade ácido tiobarbitúrico a la muestra de espermatozoides que contiene malondaldehído que se produce al formarse el peróxido de hidrógeno H_2O_2 . Al juntarse el ácido tiobarbitúrico con el malondaldehído tiñe en diferentes grados dependiendo de la concentración de ROS (31), (32).

Las ROS producen gran daño a su paso en todas las áreas de la célula espermática, pero los daños encontrados con mayor intensidad se localizan en la cadena de ADN donde produce modificación y en la membrana plasmática donde afecta la pared lipídica y provoca alteraciones en la permeabilidad (19).



Las enzimas con capacidad antioxidantes que se encuentran presentes en el semen son la glutatión peroxidasa (GSH-Px) que se encuentra unida a la membrana citoplasmática, la catalasa (CAT) localizada en el peroxisoma únicamente y la superóxido dismutasa (SOD) que se localiza tanto en la mitocondria como en el núcleo, pudiendo pasar al espacio extracelular para ejercer su acción (19).

Estas enzimas tienen como objetivo principal transformar a las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la adición de hidrógenos o la extracción de oxígeno (reducción química) que permite obtener compuestos inocuos para el espermatozoide (19). Estas enzimas pueden ser estimuladas por acción de la melatonina (18).

El oxígeno reducido ($\bullet\text{O}$) que es tóxico es transformado en peróxido H_2O_2 que es transformado por la CAT y obtiene como producto final $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ que no es tóxico. También puede tomar otra vía que mediante la GSH-Px descompone al H_2O_2 en H_2O y se produce en gran cantidad debido a que la GSH-Px se encuentra en mayor cantidad que otras enzimas, localizado dentro del espermatozoide y líquido seminal (33).

La GSH-Px tiene una forma de presentación tiólica (GSH) (34) que actúa como co-sustrato necesario para la reacción enzimática ya que esta reduce al H_2O_2 a H_2O . Luego pasa a la forma disulfatada (GSSG) que se encuentra peroxidada y oxida al H_2O y forma H_2O_2 que actúa como enzima pro-oxidante. La relación óptima entre GSH y GSSG debe ser de 99 : 1 necesarios para mantener la homeostasis en los espermatozoide (19).

Esta relación 99 : 1 puede ser posible gracias a la glutatión reductasa que colabora en la regeneración continua de la GSH adicionando hidrógeno (H) continuo que es donado por el NADPH durante el proceso del ciclo de las pentosas. Cuando se produce estrés oxidativo, la relación entre GSH y GSSG cambia y la balanza se inclina hacia la GSSG con mayor producción de peróxidos que aumenta al estrés oxidativo (19).



Es posible determinar el nivel de peroxidación presente en las muestras de espermatozoides equinos, mediante la cuantificación de malondaldehído que es un producto resultante de la peroxidación oxidativa. Al ser mezclado con el ácido tiobarbitúrico junto con el malondaldehído, forman un pigmento que puede ser medible por longitud de ondas y que permite medir el nivel de peroxidación oxidativa presente en una muestra (35).

Los procesos de manipulación desde la extracción, transporte, adición de diluyentes, procesos como centrifugación, refrigeración o también criopreservación, producen estrés celular lo que produce activación de algunas enzimas (36). Se menciona que la melatonina también puede estimular a enzimas antioxidantes presentes en los espermatozoides (36).

La SOD que protege a la célula contra el daño oxidativo desde el interior y produce H_2O_2 y O_2 que hasta cierta cantidad es necesario para la activación y reactivación de espermatozoides. Cuando existe exceso de H_2O_2 se activa la función de CAT que descompone H_2O_2 en H_2O . Catalasa se ha encontrado en plasma seminal, algunas glándulas del aparato reproductor y el líquido epididimal, es decir que es la encontrada en gran cantidad (33).

Se determinó la peroxidación lipídica en semen de caballos mediante la utilización de una sonda radiométrica (C11-BODIPY581/591) que presenta afinidad a los ácidos grasos de membrana y sirve como indicador del daño de membrana dado por los radicales libres. A la muestra se le añadió ascorbato y Hierro (Fe) en diferentes dosis que reacciona con el H_2O_2 y forma el OH que es tóxico y se encontró que concentraciones de 0,64 mM de Fe_2SO_4 y 20 mM de ascorbato inducía mayor presencia de radicales tóxicos identificados por citometría de flujo que marcó de color verde a los espermatozoides estresados (37).

Se propuso determinar la actividad de las enzimas GSH-Px, SOD y CAT en semen equino y sus aumentos o decrementos de actividad durante el almacenamiento a 5 °C donde se usaron semen fresco y diluido. Las pruebas se realizaron 24 horas posterior al almacenaje de los espermatozoides.



Después de transcurrir 24 horas, se observó que la actividad de GSH-Px fue alta en semen diluido a razón de $0,9 \text{ U}/10^6$ a las 0 horas y $1,1 \text{ U}/10^6$ células espermáticas a las 24 horas y en semen fresco se encontró $0,6 \text{ U}/10^6$, mientras que SOD localizada en mitocondria y núcleo no obtuvieron diferencias significativas siendo 25,4 y 32,5 U/mg de proteína como marcador de SOD. Mientras que la actividad de la CAT aumentó en semen diluido a 3,2 y 3,1 nkat/106. Este trabajo demuestra la actividad antioxidante aumentada de estas enzimas en presencia del proceso de refrigeración a 5° y a la vez se puede observar la baja actividad de estas enzimas en muestras de semen sin centrifugar como indicador de que este último es capaz de regular el exceso de peróxidos por la vía enzimática (33).

2.9. Fecundación in Vitro

Los avances en la producción de embriones han tenido un retraso marcado en los equinos y es debido principalmente al abandono de esta área en el campo de la investigación y la poca disponibilidad que presenta la obtención de ovocitos de yeguas en obtención principalmente de matadero, además se sabe que las técnicas de colecta son exitosas, pero la producción es relativamente baja por la escases de métodos aplicados (38).

La obtención de ovocitos se realiza principalmente en ovarios de camal en el laboratorio. Debido a la facilidad de obtención de material genético en vacas de matadero, se aplica la prueba de fecundación heteróloga para medir la capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides equinos (39).

Los ovocitos son seleccionados por micromanupulación en el estereoscopio y se escogen los del tipo A y B en base a las células de cúmulos, de la granulosa y homogeneidad del citoplasma. La calidad de los ovocitos está íntimamente ligada al posterior clivaje de los mismos (38).

Los complejos cúmulos ovocitos (COCs) pre seleccionados serán colocados en un medio enriquecido y estos colocados en la estufa de maduración que cumple con las necesidades de estos para su maduración. Este medio contiene principalmente vitaminas, hormonas y HEPES que permite mantener



el pH del medio (40).

Dentro de 20 a 24 horas posteriores a la maduración se le cambia al medio de fecundación donde son colocados también los espermatozoides previamente seleccionados y capacitados para ser capaces de fecundar. Al final se colocan en la estufa de CO₂, los COCs junto a los espermatozoides para ser analizados 2 días posteriores los supuestos cigotos (40).

Larsson et al, encontró que es posible probar el efecto de fertilización heteróloga donde participaron eyaculados bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, caninos y equinos. Estudios revelaron que si es aplicable el uso de fertilización heteróloga para predecir la capacidad fertilizante de los ovocitos (41).

Debido a la pobre disponibilidad de ovocitos equinos, se han buscado nuevos métodos que permitan realizar fecundación exitosa con el objetivo obtener mejores tasas de concepción. Es así como se usa la inyección intracitoplasmática de espermatozoides dentro del ovocito (39).

Se determinó el efecto de la aplicación de inyección intracitoplasmática de espermatozoides equinos refrigerados y descongelados en ovocitos equinos y se midió el clivaje. Se encontró que la tasa de clivaje fue significativamente más alta en espermatozoides refrigerados siendo 42 ovocitos divididos de 58 (72%) en relación al descongelado con tan sólo 32 de 58 (55%) (42).

Tras varios intentos, se intentó mejorar la calidad seminal adicionando dos diluyentes a la muestra refrigerada y congelada que se determinó por la capacidad del espermatozoide de unirse a la zona pelúcida (ZP). Son el diluyente HM-O y el Botucrio y se encontró que al inicio el botucrio demostró mayor tasa de viabilidad, pero al final la tasa de unión a la ZP similar en los dos grupos (43).

Drobnisf (44) estudió la capacitación de espermatozoides equinos en la que intentó desarrollar un método in vitro que induzca a espermatozoides de los sementales capacitarse y ser inducidos para reaccionar al acrosoma mientras



mantiene su viabilidad posterior a la exposición a progesterona. También buscaron determinar la diferencia entre espermatozoides fértiles y subfértiles a través la prueba de reacción del acrosoma. Resultó que a los espermatozoides que se les añadió progesterona tuvieron mayor incidencia de reacción del acrosoma en relación a los de la muestra control. Así mismo la prueba de reacción de acrosoma dio como resultado mayor número de espermatozoides con alta fertilidad reacciona mientras que los subfértiles obtuvieron un porcentaje inferior (22).

Fazeli & col, realizaron un trabajo de fecundación homóloga de espermatozoides equinos con ovocitos de la misma especie se estudió la capacidad de los espermatozoides de ingresar a la zona pelúcida por medio de la prueba de Hemizona a su vez teñidos con hoechst. Se encontró una diferencia significativa positiva entre los espermatozoides que se penetraron la zona pelúcida y el porcentaje de preñez encontrada (45).

Un estudio realizado en la Granja de la Universidad de Zaragoza España, utilizó el semen colectado de nueve carneros de raza aragonesa durante la temporada no reproductiva, los mismos que contaban con igual régimen alimenticio y las mismas condiciones de manejo. El semen fue tratado con 1uM, 10nM y 100 uM de melatonina, luego se incubaron a 39°C y 5% de CO₂, se procedió a evaluar parámetros como motilidad, estado de la capacidad, viabilidad y translocación de fosfatidilserina antes y después de adicionar melatonina, luego de 1 a 3 horas de incubación.

Para determinar la tasa de fertilidad de las muestras con melatonina se las determinó por medio de FIV. Al evaluar la tasa de escisión de ovocitos fertilizados, se determinó que los ovocitos fertilizados con 100 uM de espermatozoides con melatonina fueron superiores al tratamiento con 1um de melatonina y las muestras control. La melatonina ejerció un efecto directo sobre los espermatozoides en los carneros en la temporada no reproductiva, la melatonina ayuda a seleccionar las condiciones óptimas para FIV y mejorar la preservación del esperma (24).



El objetivo del ensayo realizado por Alvarenga et al., fue evaluar el fluido folicular, PC12 y el Ionóforo de calcio A23- 187 para capacitar espermatozoides provenientes de origen bovino así cómo de equino y posterior a ello analizar la capacidad de penetrar ovocitos de hámster, bovino y equinos exentos de zona. Para esto se tomó tres eyaculados de sementales, recolectados con la ayuda de una vagina artificial, luego el semen se diluyó y de esa muestra se tomó 0,1 ml y se colocó en 1ml de BGM3, luego se incubaron durante 1 hora, luego fue centrifugado y el sedimento se suspendió en BGM3 y se incubaron a 37°C durante 2 horas (47).

Las unidades de estudio o hámster hembras se superovularon y se recogieron post sacrificio los ovocitos con complejos de cúmulos luego se lavaron para eliminar dichos complejos y posterior a ellos se incubaron a 39°C y se inseminaron en 1 hora. El número de ovocitos de hámster que fueron penetrados por los espermatozoides que fueron incubados con BGM3 sólo con fluido folicular fue significativamente menor que los espermatozoides tratados con PC12 o A23187, la presencia de fluido folicular mantuvo altos porcentajes de espermatozoides móviles, pero no tuvo efecto sobre la capacidad de los espermatozoides de penetrar los ovocitos (47).

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Animales. - Se usaron 3 caballos machos en edad reproductiva (5 - 12 años), sexualmente activos, completamente sanos y que no tengan ninguna alteración o lesión en su aparato reproductivo ni locomotor.

Ovarios. - Se realizó pruebas de capacidad fertilizante in vitro de los espermatozoides usando ovocitos bovinos madurados y fecundados en el laboratorio

Diluyentes. - Se utilizó el diluyente INRA 96® e INRA FREEZE (IMV, L´Aigle, Francia) para el transporte y congelación del semen en pajillas.

Compuesto químico de tinción. - Fluorocromo Hoechst (33342, Sigma)

Instrumental. - Tijera de disección de tejidos blandos, pinza dientes de ratón, vaso de precipitación, suero fisiológico, jeringa con aguja, guantes, tubos Falcon, estereoscopio, pipeta Pasteur, caja Petri, cámara de Neubauer, termómetro, caja nunc de 4 pocillos, microscopio de fluorescencia (Olimpus, modelo CKX41), vagina artificial.

Máquinas. incubadora para maduración de ovocitos y fecundación in vitro.

3.2. Métodos

3.2.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Granja de Irquis, de la Universidad de Cuenca, ubicada en la parroquia Victoria del Portete, a 22 Km de la ciudad de Cuenca. La granja mencionada se encuentra ubicada entre las coordenadas geográficas; altitud de 2796 msnm. La precipitación anual es de 2500 mm, con temperatura que oscila entre 3 a 11°C.



Ilustración 2: *Ubicación de la granja de Irquis*



3.2.2. Metodología para la investigación experimental

- **Colecta.** - Se colectó el semen de los tres equinos dos veces por semana, hasta conseguir un total de 5 eyaculados por cada reproductor. Previo a la colecta se realizó un lavado del pene con suero fisiológico precalentado a 37°C. Para colectar el semen se eligió una yegua para estimular la erección y una vagina artificial (VA) tipo Hannover, lubricada y acondicionada a una temperatura entre 45 y 50 °C para la colecta respectiva.

La VA en el envase colector estuvo dotada de un filtro para retener la fracción gelatinosa pobre en espermatozoides. El eyaculado filtrado fue diluido en proporción 1:1 (v/v) en diluyente INRA 96® (IMV, L'Aigle, Francia) y en un lapso de tiempo de 30 minutos, trasladada la muestra al laboratorio para su análisis, procesamiento y congelación.

- **Análisis pre-congelación.** - Los eyaculados obtenidos fueron sometidos a una evaluación en la que se registró: motilidad individual progresiva, analizada de manera subjetiva con un microscopio óptico con un aumento de 200x, la concentración fue calculada con una cámara de Neubauer, las anomalías primarias y proporción de espermatozoides vivos/muertos fueron determinados con una tinción supravital de eosina-nigrosina. Esta última consiste en homogeneizar una gota de semen y otra de eosina sobre un portaobjeto, para luego colocar una gota de nigrosina y realizar el frotis.

Los espermatozoides vivos no se tiñeron, pero los muertos sí porque la membrana alterada permite el ingreso de líquidos o de colorante. Se contó un mínimo 200 células y el resultado se expresó en porcentaje. Los 15 eyaculados que se congelaron fueron los que cumplieron las siguientes características: Motilidad Individual Progresiva (MIP): >70%; Anomalías (A): < 10%; Vitalidad (V): >70%; Concentración: > 100 x10⁶/mL.

- **Procesamiento (adición de melatonina).** - Las muestras que cumplieron los parámetros descritos anteriormente fueron centrifugados a 600 gravedades x 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en medio



comercial de congelación INRA Freeze® (IMV, L'Aigle, Francia) a una concentración final de $100 \times 10^6/\text{mL}$.

- **Tratamientos.** - Inmediatamente después de la redilución, los eyaculados fueron divididos en dos alícuotas, la primera de ellas (M) fue suplementada con Melatonina (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) diluida en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) en una concentración final de $1 \mu\text{M}$; mientras que la segunda alícuota, fue tomada como Control (C), no se suplementó melatonina.
- **Congelación.** - El semen se empacó en pajuelas de 0.5 ml y se congelaron usando congelador automático (Freeze Control CL-3300, Cryologic®, Australia). Las pajuelas de semen fueron sometidas a una tasa de enfriamiento de $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ en la que la temperatura descendió de 20°C a 5°C , luego a una tasa de $-10^\circ\text{C}/\text{min}$, en la que la temperatura bajó de 5°C a -15°C y a continuación a una tasa de enfriamiento de $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ de -15°C a -120°C . Inmediatamente las pajuelas se almacenaron en nitrógeno líquido hasta -195°C hasta su evaluación. Para su evaluación se descongelaron las pajuelas a baño maría a 37°C por 1 minuto.
- **Evaluación cualitativa.** - Se realizó las siguientes determinaciones:

La motilidad individual progresiva: Se determinó de forma subjetiva considerando la proporción (porcentaje) de espermatozoides que mostraron movimiento rectilíneo (cruzan el campo del microscopio).

Proporción de vivos/muertos y anormalidades: Se realizó mediante observación de las muestras, se colocó en una placa porta objetos $10 \mu\text{l}$ de semen más $5 \mu\text{l}$ de tinción supravital y se realizó un frotis en el microscopio óptico se realizó el conteo de alrededor de 200 espermatozoides y se expresó finalmente en porcentajes.

Integridad de la membrana plasmática: Se preparó la solución hiposmótica que consistió en mezclar $0,675 \text{ g/l}$ de fructosa anhidra y $0,268 \text{ g/l}$ de citrato de sodio con agua bidestilada, por 55 mosm/l , tal como lo indica Sánchez, Rubilar,



Gatica (2002). Para esta determinación se colocó 10 μ l de semen en 100 μ l de la solución hiposmótica, la mezcla se incubó en una estufa a 37°C por 45 minutos para luego realizar un frotis para determinar la proporción de células que respondieron positivamente (cola enrollada) al test.

Integridad acrosomal: Se determinó mediante la tinción comercial Spermac[®], esto se lo realizó usando varios tiempos de intervalo entre tinción, siguiendo indicaciones del producto usado para el procedimiento se usaron la tinción de fijación y luego los colorantes A, B y C, todo esto permitió identificar la proporción de espermatozoide con la membrana acrosomal externa intacta o en su defecto, una alteración en la misma, se contabilizaron 200 espermatozoides, y se las categorizó en reaccionado y no reaccionados, y finalmente se los expresó en porcentajes.

- **Evaluación del estrés oxidativo.** La evaluación del estrés oxidativo de los espermatozoides se realizó usando la metodología descrita por Rodriguez et al. Se usó la prueba fluorescente CellROX Deep Red[®] (CAT 10422 – Molecular Probes; Life Technologies, NY, USA), y para ello la muestra fue diluida en Dimetilsulfoxido (DMSO; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a una concentración de 1mM (75 μ l de DMSO en 50 μ l de CellROX), fue congelada a -20°C y almacenada hasta su uso (32).

Para la evaluación se descongeló una pajuela por cada repetición de los 2 grupos experimentales (Melatonina y Control). Para la tinción propiamente dicha, se tomó 200 μ L de cada muestra de semen descongelado y se le añadió 0.5 μ L de CellROX (1mM) y 2 μ L de Hoechst 33342 [diluido en PBS a una concentración de 1mg/ml (p/v)] y las muestras teñidas fueron incubadas a 37°C por 30 minutos.

Una vez finalizada la incubación, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 2000 gravedades, el sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en 200 μ L de PBS. Una alícuota de 5 μ L fue colocada entre un porta y cubreobjetos y observado en un microscopio de fluorescencia a 400x



aumentos. En cada muestra fueron contadas 200 células y luego clasificadas según su grado de estrés oxidativo en:

- Espermias sin estrés oxidativo. - Pieza intermedia y cola sin tinción.
 - Espermias con estrés oxidativo moderado. - Pieza intermedia y cola teñida de rojo pálido.
 - Espermias con estrés oxidativo intenso. - Pieza intermedia y cola teñida de rojo intenso.
- **Evaluación de la capacidad fecundante del semen equino**
 - **Obtención y Maduración de ovocitos bovinos:** Se obtuvieron ovarios que provenían de vacas de matadero no gestantes y con clínicamente sanas y con buena condición. Los ovarios seleccionados se les retiró las estructuras como oviducto, cuerno uterino y vasos periféricos para luego ser colocados en un termo provisto de suero fisiológico (NaCl 0,9%) a temperatura entre 30 y 37°C para ser transportados al laboratorio en un tiempo máximo de 2 horas.

Los ovarios fueron lavados con suero fisiológico a 38°C para retirar restos de sangre y secados con papel. Luego, todos los folículos entre 2 a 10 mm de diámetro fueron puncionados con una jeringa acoplada a una aguja calibre 20 G y el líquido folicular recuperado fue colocado en tubos Falcon de 15 ml.

Los ovocitos acumulados en el fondo del tubo Falcon fueron aspirados con una pipeta Pasteur y se depositaron en una caja Petri plástica, para luego ser recuperados bajo un estereoscopio con 30x de aumento, y transferidos con una micropipeta a gotas de H-SOF para lavarlos. Únicamente fueron seleccionados para ser madurados los ovocitos de categoría A y B, según el criterio clasificación indicado por Hawk y Wall (1994) y descrito brevemente a continuación: calidad A, ovocito de apariencia compacta, con múltiples capas (>4) de células del cúmulo y con citoplasma granular uniforme y transparente; calidad B, ovocito con 1 a 3 capas de células del cúmulo que cubren la zona pelucida, con citoplasma opaco, total o parcialmente homogéneo y finamente granuloso; calidad C, ovocitos parcial o totalmente desnudos, y/o citoplasma



con zonas oscuras irregulares; calidad D, ovocitos deformados con células de la granulosa que cubren parcial o totalmente la zona pelúcida o completamente expandidos con cumulo disperso y descolorido (48).

Los COCs previamente seleccionados fueron colocados en un medio de maduración preparado a base de TCM 199, el mismo que fue suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina. Cada grupo de COCs (con y sin melatonina) fueron colocados a madurar en microgotas (cubiertas con aceite mineral) 100 µl en placas de Petri de 5 cm, en una estufa con CO₂ a 5%, 38.5 °C y humedad de saturación, por un período de 18 a 24 horas.

- **Fecundación:** Los espermatozoides fueron centrifugados en columnas de Percoll en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, lo cual permitió obtener espermatozoides más viables y aquellos no viables, se quedaron en el sobrenadante y el pellet obtenido se le añadió una dosis de heparina para inducir la capacitación; luego fueron centrifugado otra vez y contados en una cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, y calcular la dosis de semen a colocar en el medio de fecundación con los ovocitos previamente madurados.

- **Tinción Hoechst**

Los ovocitos fecundados separados por tratamientos con melatonina, sin melatonina y homólogos; son sometidos a un protocolo de tinción, el mismo que se elabora previamente y a continuación la descripción del proceso.

1. Se prepara el stock Hoechst (HS), el mismo que se elabora disolviendo 1mg de Hoeschst en 1 ml de H- SOF y se lo almacena a 4°C protegiéndole de la luz.
2. Realizamos la tinción Hoechst usando 5ml de (HS) diluido en 1 ml de H-SOF.
3. Elaboramos el medio de montaje, utilizando 1 ml de H- SOF, más 1 ml de Glycerol y 1 µl de HS.

4. Preparamos la solución de fijación (SF), mezclando 750 μ l más 250 μ l de Glutaraldehído al 2%.
5. Con la ayuda de una caja nunc de 4 pocillos se realizó el proceso de tinción, en el primer pocillo colocamos los ovocitos ya fecundados en 500 μ l de (SF) durante 20 minutos a temperatura ambiente, pasamos los ovocitos del pocillo anterior al segundo pocillo en el que previamente colocamos 500 μ l de H-SOF durante 5 minutos, posteriormente trasladamos los ovocitos al tercer pocillo en el que previamente colocamos 500 μ l de (H) durante 15 minutos a 4°C libre de luz y en el cuarto pocillo por ultimo colocamos los ovocitos con 500 μ l de H-SOF durante 5 minutos a temperatura ambiente.

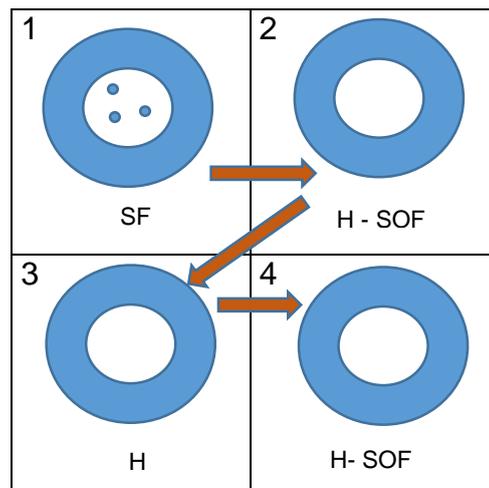


Ilustración 3: Proceso de tinción de los presuntos cigotos

6.- Finalmente los ovocitos sometidos a tinción son colocados de 2 – 3 estructuras sobre una placa porta objetos a la que previamente anclamos 5 gotas usando el medio de montaje antes elaborado a razón de 1 μ l por gota, cubrimos y sellamos sus bordes para luego ser analizadas con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Olimpus, modelo CKX41, Alemania). Este proceso antes descrito se lo realiza de forma repetitiva en varios tiempos para observar las diferentes fases de fecundación heteróloga, iniciando con la observación de bound a las 2,5 horas post inseminación, luego a las 12 horas observamos penetración y poliespermia, posteriormente a las 18 horas observamos pronúcleos y a las 24 horas, observamos también pronúcleos.

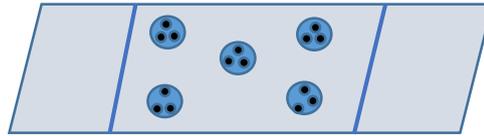


Ilustración 4: Fijación de muestras al portaobjetos

- **Determinación de la capacidad fecundante:** A las 24 horas después de haberse colocados en la estufa de fecundación, los presuntos cigotos fueron desnudados, expuestos por 15 minutos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma) en concentración de $1\mu\text{g/ml}$ (p/v), y colocados en el microscopio un microscopio de fluorescencia (Olimpus, modelo CKX41, Alemania) para cuantificar la cantidad de ovocitos que fueron fecundados.

3.2.3. Variables de estudio y diseño Experimental

Se consideraron como variables independientes el tratamiento (M, C), el semental (1, 2 ,3) y el día de colección (repetición, 1 a 5), y como variables dependientes la motilidad individual progresiva (%), % de espermatozoides (esp.) vivos/muertos, % de esp. con anormalidades, % de esp. que reaccionan al test de HOST, % de esp. con la membrana acrosomal intacta, % de esp. que presentan estrés oxidativo, % de ovocitos bovinos fecundados por esp. equinos.

Se usó un diseño completamente aleatorizado, y los datos fueron procesados mediante el análisis de varianza usando el procedimiento GLM (General Lineal Model) del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, 2013). Las diferencias entre medias se compararon con el procedimiento LS Means del SAS.



4.1. Operacionalización de las variables

Problema	Hipótesis	Variabes	Indicadores	Medidas	Fuente de Información	Análisis de Información
<p>Valorar las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides equinos criopreservados en presencia de melatonina</p>	<p>La adición de melatonina antes de la criopreservación de semen equino previene el estrés oxidativo, el deterioro de la calidad espermática y la pérdida de la capacidad fecundante</p>	<i>Variabes independientes</i>				
		Tratamiento	Melatonina	presencia (M) o no (C)	Rodrigues et al. (32)	ANOVA
		Semental	Caballo	1-3	No hay	ANOVA
		Repetición	Día de colecta	1-5	No hay	ANOVA
		<i>Variabes dependientes</i>				
		Motilidad individual progresiva	Porcentaje	0-100	Love CC, et al. (15).	ANOVA
		Espermatozoides vivos/muertos	Porcentaje	0-100	Love CC, et al. (15)	ANOVA
		Espermatozoides con anormalidades	Porcentaje	0-100	Love CC, et al. (15)	ANOVA
		Espermatozoides que reaccionan al test de HOST	Porcentaje	0-100	Thomson Gale, et al. (49)	ANOVA
		Espermatozoides con la membrana acrosomal intacta	Porcentaje	0-100	Sánchez A. Garrido D, et al. (50)	ANOVA
		Espermatozoides que presentan estrés oxidativo	Porcentaje	0-100	Rodrigues et al. (32)	ANOVA
		Ovocitos bovinos fecundados por espermatozoides equinos	Porcentaje	0-100	A. R. Fazeli, W. Steenweg, M. M. Bevers, J van den Broek, V. Bracher JP and BC , et al. (45)	ANOVA



4. RESULTADOS

4.1. Semen fresco

La Tabla 1 muestra las características del semen fresco de los 3 sementales sometidos a estudio, que cumplieron con los parámetros necesarios para ser criopreservados. Todas las muestras fueron similares en la mayoría parámetros, únicamente el semental 2, en la variable motilidad fue superior ($p < 0,05$) con relación al resto de sementales ($92,0 \pm 1,3$ vs $86,0 \pm 1,3$ y $87,0 \pm 1,3$).

Tabla 1: Parámetros del semen fresco de acuerdo a cada semental

Variables	Semental		
	1	2	3
Volumen (ml)	$55,0 \pm 4,66^a$	$43,0 \pm 4,66^a$	$53,0 \pm 4,66^a$
% Motilidad	$86,0 \pm 1,26^a$	$92,0 \pm 1,26^b$	$87,0 \pm 1,26^{a,b}$
% Vivos	$92,6 \pm 2,07^a$	$87,7 \pm 2,07^a$	$93,2 \pm 2,07^a$
% Anormales	$4,8 \pm 1,63^a$	$5,4 \pm 1,63^a$	$6,0 \pm 1,63^a$

Los valores mostrados son la media \pm error estándar

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencia significativa $a, b P < 0,05$



4.2. Semen descongelado por tratamiento

En los resultados obtenidos de pruebas microscópicas y subjetivas de muestras descongeladas por cada tratamiento (Tabla 2), se encontró que el porcentaje de vivos en el tratamiento sin melatonina fue mayor ($p < 0,05$) que el tratamiento con melatonina ($85,1 \pm 1,7$ vs $80,0 \pm 1,7$), pero en el porcentaje de espermatozoides con la membrana íntegra según el test de HOS, el tratamiento con melatonina fue superior ($p < 0,05$) al tratamiento sin melatonina ($31,3 \pm 1,8$ vs $25,2 \pm 1,8$). En los parámetros de Motilidad, Anormales e Integridad Acrosomal los dos tratamientos se comportaron igual.

Tabla 2: Parámetros seminales obtenidos de muestras descongeladas por tratamiento

Variables	Tratamiento	
	Con Melatonina	Sin Melatonina
% Motilidad	$57,0 \pm 1,86^a$	$54,8 \pm 1,86^a$
% Vivos	$80,0 \pm 1,73^a$	$85,1 \pm 1,73^b$
% Anormales	$5,7 \pm 0,33^a$	$5,0 \pm 0,33^a$
% Hos Test	$31,3 \pm 1,78^a$	$25,2 \pm 1,78^b$
%Anormalidad acrosomal	$8,8 \pm 0,82^a$	$7,6 \pm 0,82^a$

Los valores mostrados son la media \pm error estándar

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencia significativa $a, b P < 0,05$



4.3. Niveles de estrés oxidativo por tratamiento

Según la evaluación realizada con la tinción Cell Rox Deep Red, resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 4 no se evidencian diferencia estadística significativa ($P > 0,05$), no obstante, hay una diferencia numérica en el que el nivel de estrés fue menor en el tratamiento con melatonina.

Tabla 3: Niveles de estrés oxidativo por tratamiento en semen descongelado con o sin melatonina

Variables	Tratamiento	
	Con Melatonina	Sin Melatonina
% Sin Estrés	84,2 ± 9,28	72,3 ± 9,28
% Estrés Moderado	7,0 ± 3,99	11,0 ± 3,99
% Estrés Intenso	1,6 ± 0,71	1,8 ± 0,71

Los valores mostrados son la media \pm error estándar

4.4. Fecundación Heteróloga

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos de fecundación in vitro utilizando ovocitos bovinos con espermatozoides equinos descongelados con y sin adición de melatonina. En los resultados obtenidos de la unión de espermatozoides a la zona pelúcida observados a las 2,5 horas posteriores a la inseminación, se encontró una diferencia significativa mayor en la FIV homóloga en comparación a los tratamientos anteriores ($22,8 \pm 4,0$ vs $5,5 \pm 4,0$; $3,6 \pm 4,0$). En los resultados obtenidos de penetración a las 12 horas se encontró que el tratamiento con melatonina fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina ($24,0 \pm 10,9$; $26,6 \pm 10,9$ vs $51,4 \pm 10,9$), pero fue estadísticamente menor a la FIV homóloga, mientras que la FIV homóloga fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina ($51,4 \pm 10,9$ vs $26,6 \pm 10,9$). En la polispermia el tratamiento con melatonina fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina, pero ambos fueron estadísticamente menores a la FIV heteróloga ($15,9 \pm 8,6$; $13,0 \pm 8,6$ vs $35,6 \pm 8,6$). En los resultados obtenidos de pronúcleos a las 18 y 24 horas, así como de clivaje, se encontró que el tratamiento con melatonina fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina, pero ambos fueron diferentes a los resultados obtenidos de la FIV homóloga.



Tabla 4: Fecundación heteróloga en ovocitos bovinos con espermatozoides equinos criopreservados con y sin melatonina

Variables	Tratamiento		
	Con Melatonina	Sin Melatonina	FIV Homologa
% Unión (2,5 h)	5,5 ± 4,05 ^a	3,6 ± 4,05 ^a	22,8 ± 4,05 ^b
% Penetración (12 h)	24,0 ± 10,98 ^a	26,6 ± 10,98 ^a	51,4 ± 10,98 ^a
% Poliespermia (12 h)	15,9 ± 8,59 ^a	13,0 ± 8,59 ^a	35,6 ± 8,59 ^a
% Pronúcleos 18 h	2,1 ± 11,04 ^a	22,0 ± 11,04 ^a	60,9 ± 11,04 ^b
% Pronúcleos 24 h	20,6 ± 11,64 ^a	16,2 ± 11,69 ^a	61,8 ± 11,69 ^b

Los valores mostrados son la media ± error estándar

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencia significativa ^{a, b} P<0,05

Tabla 5: Tasa de clivaje en ovocitos bovinos incubados con espermatozoides equinos criopreservados con y sin melatonina

Tratamiento	Variables
	% Clivaje
Con melatonina	33,3 ± 6,50 ^a
Sin melatonina	20,5 ± 6,50 ^a
FIV Homologa	59,0 ± 6,50 ^b
Partenogénesis	21,8 ± 6,48 ^b

Los valores mostrados son la media ± error estándar

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencia significativa ^{a, b} P<0,05



5. DISCUSION

Para intentar minimizar la peroxidación se han ensayado varios antioxidantes, evaluando sus efectos sobre los espermatozoides. Según Maxwell y Stojanov et al., (51) estudiaron en el carnero sistemas enzimáticos SOD (superóxido dimultasa), citocromo y catalasa, antioxidantes que de alguna forma mejoraron la movilidad e integridad acrosomal del espermatozoide. Sin embargo, Ball et al., (37) menciona que la adición de catalasa no ha logrado mejorar significativamente, la viabilidad, motilidad y la integridad acrosomal del espermatozoide equino, de hecho, según Aurich et al., (52) alega que la catalasa incluso puede disminuir la movilidad progresiva de los espermatozoides en semen almacenado a 5°C. Aunque muy pocos estudios han abordado el efecto de la melatonina en los espermatozoides en mamíferos, la mayoría de ellos han demostrado resultados positivos previniendo los cambios apoptóticos según lo menciona Casao A, Mendoza N, Pérez R et al., (24) quienes realizaron estudios en semen de carnero agregando melatonina a razón de 1 µM y concluyeron que la exposición de los espermatozoides de carnero a la melatonina, tenían efectos directos al disminuir los cambios apoptóticos y aumentar la capacitación a corto plazo y se pudieron atribuir estos resultados a la gran capacidad de la melatonina como secuestrante de ROS.

La motilidad es uno de los parámetros importantes al momento de estimar el potencial fecundante de los espermatozoides, al ser sometidos a congelación – descongelación se prevé un descenso en el cuál la motilidad no debe ser inferior al 20% según Braun J et al ., (53). Los resultados obtenidos en la Tabla 2 mostraron rangos aceptables post descongelación, pero no hubo diferencia significativa ($P>0,05$), en ninguno de los tratamientos, es decir, con melatonina y sin melatonina. A pesar de ello los resultados obtenidos se encontraban dentro del rango aceptable, aunque con leves variaciones no significativas entre tratamientos sin embargo se podría considerar el uso de semen para IA en pruebas de campo.

Después de la colecta y procesamiento, obtuvimos los resultados de parámetros del semen que cumplían con las características necesarias para ser



crioconservados, mismos que se describen en la Tabla 1 en la que pudimos encontrar que no hubo diferencia estadística entre volumen de semen producido en cada colecta de principio a fin, aunque generalmente se encuentra estrechamente relacionado con la edad de los sementales según señala Dowsett et al,(54). El porcentaje de motilidad presentó una diferencia entre muestras, aunque al ser una prueba subjetiva, tiende a ser poco fiable.

El Hos Test ha sido validado para el semen equino por Neild et al (56) y Nie y Wenzel (57) sin embargo, su uso en estudios sobre la calidad del semen equino es aún limitado. Neild et al (58) en uno de sus estudios mostró que la prueba hipoosmótica proporcionó una evaluación simple de la función de la membrana y los resultados obtenidos mostraron que los sementales con bajo porcentaje de Hos T (<40%) eran de dudosa fertilidad. En nuestro estudio usando la melatonina no obtuvimos bajos valores en el Hos test, de hecho, encontramos que aquellos eyaculados que fueron sometidos a la adición del antioxidante, en la tabla 2, mostraron ser superiores a las muestras control, demostrando resistir el proceso de congelación, protegiendo la integridad de membrana.

En la tabla 2 logramos clasificar las muestras divididas por tratamientos en la que encontramos que la tasa mótil no presentó diferencia entre tratamientos ($57,0 \pm 1,86$ vs $54,8 \pm 1,86$) que no coinciden siendo menor con los resultados obtenidos de Ortiz & col, (5) que, al descongelar las muestras de espermatozoides, encontraron un 70% de mótils en relación al tratamiento sin melatonina que presentó un 45% de mótils; así como Ashrafi & col (4) que encontraron diferencia significativa mayor entre los tratamientos con melatonina (1 mM y 2 mM) y el control ($60,8 \pm 4,0$; $62,5 \pm 4,2$ vs $43,0 \pm 2,4$). Además, Fujinoki et al, (6) señala que dosis muy altas de melatonina pueden impedir la hiperactivación de los espermatozoides siendo perjudicial. Así también la tasa de vivos fue significativamente mayor en el tratamiento sin melatonina al compararse con el tratamiento con melatonina ($85,1 \pm 1,7$ % vs $80,0 \pm 1,7$ %) respectivamente ($P < 0,05$) lo cual resulta contradictorio al resultado obtenido por Balao da Silva & col, (3) y de Ortiz & col, (5) en el cuál no encontró diferencia significativa entre tratamientos, al rededor del 70% de vivos con el tratamiento



con melatonina y apenas el 35% en el control. Al realizar la prueba de test hiposmótico (Hos T) se encontró una diferencia significativa mayor en el tratamiento con adición de melatonina al compararlo con el tratamiento sin melatonina ($31,3 \pm 1,8 \%$ vs $25,2 \pm 1,8 \%$), resultados que coinciden con los obtenidos por Balao Da Silva & col., (3) y Ashrafi & col, (4) que demostraron que en los tratamientos que contenían melatonina a razón de 0,1 mM, 1 mM, 2 Mm y 3 Mm presentaron diferencia estadística mayor con respecto al tratamiento control, al presentar protección de membrana plasmática ($58.4 \pm 2.5\%$, $66.4 \pm 1.8\%$, $68.3 \pm 1.4\%$ $67.8 \pm 1.1\%$ vs $50.3 \pm 2.4 \%$) respectivamente ($P < 0,05$). T. Katila et al.,(16) describe que el semen equino muchas veces resulta difícil criopreservarlo ya que luego de sufrir el proceso de congelación se pierde un alto porcentaje de viabilidad debido a una alteración en su metabolismo, lo que resulta en una limitante al momento de buscar una preñez exitosa. Los valores obtenidos en el grupo control también se asemejan a los realizados por Kuisma & col, (7). Además, resultados que coinciden con los obtenidos por Aurich & col, (3) y Casao & col, (4) que demostró que en los tratamientos que contenían melatonina a razón de 0,1 mM, 1 mM, 2 Mm y 3 Mm presentaron diferencia estadística mayor con respecto al control, ya que presentaron protección de membrana plasmática ($58.4 \pm 2.5\%$, $66.4 \pm 1.8\%$, $68.3 \pm 1.4\%$ $67.8 \pm 1.1\%$ vs $50.3 \pm 2.4 \%$). También coincide con Sieme & col, (8) que realizaron la prueba de Hos T en muestras de semen equino criopreservado y obtuvieron resultados similares siendo ($50.2 \pm 13.1 \%$); respectivamente ($P < 0,05$). Los resultados obtenidos de espermatozoides que presentan reacción acrosomal, demuestran no diferencia estadística entre los tratamientos lo cual no coincide con los resultados obtenidos por Rodrigues et al, (32) quienes congelaron las muestras de semen con el mismo diluyente que en nuestro estudio (INRA 96) y al obtener el porcentaje de membrana acrosomal intacta resultó en $29,0 \% \pm 8,91$. En un estudio Zi & col, (9) describen que un alto porcentaje de espermatozoides que contienen membrana acrosomal intacta, está estrechamente relacionado con la capacidad fecundante de los mismos.

Morillo et al., (60) menciona que la membrana plasmática del espermatozoide posee una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, los mismo que son



susceptibles a sufrir peroxidación lipídica, sobre todo si son sometidos a cambios de temperatura, cuando se lleva a cabo este proceso, los ácidos grasos que ayudan a la fluidez a la membrana, se modifican, lo que resulta en una alta peroxidación lipídica, reduciendo así la funcionalidad espermática, reflejada en daño estructural de la membrana, particularmente en la región acrosómica.

Un estudio realizado en semen humano, tanto fresco como congelado R. Hauster, H Yavetz, G.F.Paz, Z.T.Homonnai, A.Amit, J.B.Lessing, M.R.Peyser, L.Yogev et al., (61) mencionan que el HOST tiene un valor predictivo para la fertilización de ovocitos en los ciclos de FIV, cuando se usa semen fresco, peor no es esperma congelado, debido a que el proceso de congelación – descongelación afecta drásticamente la membrana externa del espermatozoide y cambia sus características lo que conduce a una disminución de los valores de HOST.

Según investigadores como Zamira Gibb y Robert J. Aitken., (59) mencionan que la congelación de espermatozoides es la técnica más ampliamente usada para el transporte y almacenamiento de espermatozoides, muchos de los que realizan estos procedimientos usan dispositivos comerciales de enfriamiento pasivo, que logra enfriar el semen lentamente a una temperatura de 4 – 10 °C, logrando restringir el metabolismo del esperma y manteniendo una funcionalidad aceptable hasta 72 horas. Sin embargo, el semen de equino es significativamente más susceptible al choque de frío que el de otras especies, y lo relacionan probablemente a una menor proporción de colesterol a fosfolípidos en las membranas de los espermatozoides, resultando en tasas de éxito muy bajas de hasta 44% por ciclo. Al igual que sucede con la criopreservación, los investigadores mencionan que existen importantes diferencias inexplicables entre los mismos sementales aun si son de la misma raza en cuanto a la capacidad de su semen para almacenamiento a bajas temperaturas.

Gracias a la tinción CellRox Deep Red, se logró clasificar de manera objetiva a los espermatozoides que presentan estrés oxidativo y los resultados pueden ser observados en la tabla 3 en la que no reveló diferencia significativa entre tratamientos. Los resultados no coinciden con los obtenidos por Deep & col, (62)



que demostraron la eficacia de detección de estrés oxidativo del Cell Rox aplicado sobre espermatozoides de carneros con degeneración testicular junto a un grupo control y encontró diferencia estadística entre ambos ($25,43 \% \pm 3,41$ vs $15,68 \% \pm 2,92$). Así también no coinciden con Rodrigues et al, (32) quien probó muestras de semen equino en fresco como grupo control y otro grupo a la que se le indujo estrés y al obtener los resultados, se encontró que el control demostró diferencia significativa menor al grupo presuntamente estresado ($8,15 \% \pm 3,03$ vs $81,75 \% \pm 3,16$).

Según Angel D, Bran JA et al.,(1) la criopreservación en equinos no resulta tan efectiva como en bovinos u otros mamíferos, mostrando una alta variabilidad de éxito incluso entre reproductores de la misma raza. El semen sometido a shock térmico presenta cambios no deseados produciendo en el espermatozoide, daño oxidativo en la membrana y estrés osmótico alterando el metabolismo del mismo. En nuestro proyecto investigativo en la Tabla 4 la melatonina agregada a las muestras de semen previas a la congelación, no mostraron diferencia significativa ($P < 0,05$) frente al grupo control, lo que no demuestra la función antioxidante de la melatonina frente a los espermatozoides estresados.

Luego se realizaron pruebas de fecundación in vitro, obtuvimos los resultados de que determinaron la capacidad fecundante de los espermatozoides sometidos al estudio y que se encuentran en la tabla 6. Al obtener los resultados de la unión de espermatozoides a la zona pelúcida observados a las 2,5 horas posteriores a la inseminación, se encontró una diferencia significativa mayor en la FIV homóloga en comparación a los tratamientos anteriores ($22,8 \pm 4.0$ vs $5,5 \pm 4.0$; $3,6 \pm 4.0$), respectivamente ($P < 0,01$), lo cual no coincide con Sánchez et al, (7) que encontró diferencia significativa entre la FIV homóloga y la heteróloga ($0,83 \pm 2,4\%$ y $0,8 \pm 1,8\%$) , así como en otro estudio realizado por Pradie et al, (63) en el cuál se encontró diferencia estadística mayor en el de FIV heteróloga al compararla con el control ($1,7 \pm 1,7 \%$ vs $0,3 \pm 0,6\%$). Aun así, el resultado numérico que presentó la FIV heteróloga, es muy similar al encontrado por que utilizó ovocitos bovinos maduros y sin madurar ($25 \pm 16\%$ vs $27 \pm 18\%$), aunque



no coincide con los resultados obtenidos de Gañán et al, (64) que encontró una tasa de unión o Bound a razón de $2.1 \pm 0.9\%$ respectivamente, ($P < 0.05$).

En los resultados obtenidos de penetración a las 12 horas se encontró que el tratamiento con melatonina fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina ($24,0 \pm 10,9$; $26,6 \pm 10,9$ vs $51,4 \pm 10,9$), pero fue estadísticamente menor a la FIV homóloga, mientras que la FIV homóloga fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina ($51,4 \pm 10,9$ vs $26,6 \pm 10,9$), lo cual demuestra ser similar a los resultados obtenidos por Neild et al, (65) que demostró diferencia significativa mayor en el grupo control en relación a la FIV heteróloga ($1,1 \pm 0,6\%$ vs $0,7 \pm 0,7\%$). Así también Lavara & col, (55) han encontrado estrecha relación entre la alta tasa de muertos y anormales con la baja capacidad fecundante de los espermatozoides.

Al obtener los resultados de polispermia, se encontró que el tratamiento con melatonina fue estadísticamente igual al tratamiento con melatonina, pero ambos fueron estadísticamente menor a la FIV heteróloga ($15,9 \pm 8,6$; $13,0 \pm 8,6$ vs $35,6 \pm 8,6$), resultado que no fue diferente al encontrado por Sánchez & col, (7) que encontró diferencia estadística entre el grupo control y la FIV heteróloga ($11,0 \pm 4,2\%$ vs $0,0 \pm 0,0\%$), respectivamente ($P < 0.05$) y de igual manera a los resultados obtenidos por (Pradieé, et al., 2018) a razón de ($1,1 \pm 0,2\%$ vs $3,3 \pm 0,3\%$), respectivamente ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos de la tasa de pronúcleos formados del tratamiento con y sin melatonina más el control heterólogo a las 18 horas ($2,1 \pm 11,0$; $22,0 \pm 11,0$ vs $60,9 \pm 11,0$) y 24 horas ($20,6 \pm 11,7$; $16,2 \pm 11,7$ vs $61,8 \pm 11,7$), se encontró que el tratamiento 1 fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina, pero ambos fueron diferentes a los resultados obtenidos de la FIV homóloga; mismos que son similares a los obtenidos por Sánchez & col, (7) con diferencia estadística mayor en el control al comparar con la FIV heteróloga ($75,9 \pm 12,9\%$ vs $25,2 \pm 7,4$) respectivamente ($P < 0.05$). Así como Pradie et al, (65) con resultados estadísticamente similares ($67,7 \pm 9,8\%$ vs $21,3 \pm 13,9\%$). Al evaluar clivaje, se encontró que el tratamiento 1 fue estadísticamente igual al tratamiento sin melatonina, pero ambos fueron diferentes a los resultados



obtenidos de la FIV homóloga ($36,3 \pm 7,6\%$; $19,5 \pm 7,6\%$ vs $59,8 \pm 5,6\%$), además, se evaluó partenogénesis y se encontró que fue estadísticamente similar a los resultados obtenidos de la FIV heteróloga ($21,8 \pm 5,6\%$ vs $36,3 \pm 7,6\%$; $19,5 \pm 7,6\%$).

Estos resultados fueron numéricamente similares al obtenido por Roth et al, (66) a razón de 40% de ovocitos clivados, así como respectivamente ($P < 0.05$); aunque fueron estadísticamente mayores a los obtenidos por Gañan et al, (64) con tan sólo $11,3 \pm 5,3 \%$. Resultados que fueron diferentes a los resultados obtenidos por Sánchez & col, (7) los cuáles obtuvieron diferencia estadística mayor en la FIV heteróloga frente a la homóloga o control ($89,3 \pm 18,5\%$ vs $34,8 \pm 5,9\%$), pero similares a los obtenidos por Pradie et al, (65) quién encontró diferencia estadística menor en el grupo control, al compararlos con la FIV heteróloga ($76,1 \pm 15,9 \%$ vs $31,3 \pm 27,2 \%$), pero la FIV heteróloga fue estadísticamente mayor a los resultados obtenidos de partenogénesis ($31,3 \pm 27,2 \%$ vs $8,3 \pm 2,5 \%$) Pradie et al, (65) y ($89,3 \pm 18,5\%$ vs $8,0 \%$) Sánchez & col, (7); resultados que presentan diferencia a los obtenidos en nuestro estudio.



6. CONCLUSIONES

La melatonina adicionada en los espermatozoides previo a la congelación de las muestras, demostró tener una eficaz capacidad antioxidante al proteger a los espermatozoides frente al estrés oxidativo y envejecimiento prematuro, que fue evidenciado al descongelar y evaluar las muestras.

Las muestras de semen descongelada con melatonina tuvieron una menor proporción de espermatozoides vivos y una mayor cantidad de espermatozoides con la membrana plasmática intacta que los descongelados sin melatonina. En las demás variables estudiadas las diferencias fueron estadísticamente similares.

El estrés oxidativo medido de manera objetiva en semen descongelado a través de la tinción CellRox Deep Red, demostró que los resultados del grupo que contenía melatonina fue igual al obtenido del grupo control, en el cuál la melatonina no demuestra tener acción antioxidante sobre los espermatozoides tratados.

La capacidad fecundante de espermatozoides equinos mediante fecundación heteróloga fue baja en relación al grupo control o fecundación homóloga, sin embargo, entre tratamientos con y sin melatonina, en los porcentajes de unión, penetración, poliespermia y pronúcleos a las 18 y 24 horas, no hubo diferencia estadística significativa.

La utilización de las técnicas de reproducción asistida es una realidad en cualquier sistema de producción equina de mediana a alta complejidad, aunque la técnica de criopreservación es una de las muchas técnicas empleadas, conllevan un costo considerable y requieren de investigación, es por ello que van dirigidas a una élite de individuos de alto valor genético, afectivo y para solucionar problemas de infertilidad puntuales.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Angel D, Bran JA. Reproducción asistida en equinos : aportes desde la teoría * Assisted reproduction in horses : contributions from theory Resumen Palabras clave Key words Introducción. Rev CES Med Veterinaria y Zooecnia. 2010;5(1):56–69.
2. Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, De J. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation q. 2007;54:27–35.
3. Brea JJGL-. Nuevos y Antiguos retos de la Espermatología Veterinaria. Mancha U de C- La, editor. España; 2017. 30-58 p.
4. Ruiz M. Inseminación artificial en equinos. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”; 1997.
5. Carpentieri A, Barboza GD De, Areco V, López MP, Talamoni NT De. New perspectives in melatonin uses. Pharmacol Res. 2012;65(4):437–44.
6. Balao CM, Macı B, Pen FJ. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. 2011;172–9.
7. Sánchez-calabuig MJ, Fuente J De, Laguna-barraza R. Theriogenology Heterologous murine and bovine IVF using bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) spermatozoa. Theriogenology. 2015;84(6):983–94.
8. Palma GA. Biotecnología de la Reproducción. 2 ed. Mar del Plata; 2008. 547-581 p.
9. J. Warren Evans, A. Borton, H.F. Hintz LDVV. El Caballo. Zaragoza - España; 1977. 371-376 p.
10. I GRB, Esteban J, Cortés D, Alberto B, Iii R. Efecto de la quercetina , la L-ergotioneina y la pentoxifilina en el semen equino posdescongelado. 2016;38(3):154–63.
11. N. Edward Robinson KAS. Terapéutica Actual en Medicina Equina. 6 ed. Buenos Aires - Argentina: Editorial Inter - Médica S.A.I.C.I.; 2012. 895-899 p.
12. Consuelo D, Dalmau S. Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. Rev Complut Ciencias Vet. 2012;125–34.
13. Villa. Recoleccion, evaluacion y conservacion de semen equino. Tesis



- Maest. 2012;1–9.
14. J.Derivaux. Reproducción de los Animales Domésticos. 2 ed. Zaragoza - España; 1976. 176 p.
 15. Love CC. Modern Techniques for Semen Evaluation Semen Semen evaluation Fertility Stallion Breeding. 2016;32:531–46.
 16. Katila T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. Acta Vet Scand. 2001;42(2):199–217.
 17. Thomson Gale (Firm) JL, Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. División de Investigación. AA, González Villalobos DM. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Vol. 19, Revista Científica. UNIVERSIDAD DEL ZULIA; 2009. 382-389 p.
 18. Guerrero JM, Carrillo-vico A, Lardone PJ. La melatonina. Investig Cienc. 2007;30–8.
 19. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. J Biomed Sci. 2000;7(6):444–58.
 20. Cebrián-Pérez JA, Casao A, González-Arto M, Dos Santos Hamilton TR, Pérez-Pé R, Muño-Blanco T. Melatonin in sperm biology: Breaking paradigms. Reprod Domest Anim. 2014;49(s4):11–21.
 21. Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. J Pineal Res [Internet]. 2000 Jan [cited 2017 Sep 24];28(1):52–63. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-079x.2000.280108.x>
 22. González-Arto M, Vicente-Carrillo A, Martínez-Pastor F, Fernández-Alegre E, Roca J, Miró J, et al. Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. Theriogenology [Internet]. 2016;86(8):1958–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.016>
 23. Cebrán-Pérez JA, Casao A, González-Arto M, Dos Santos Hamilton TR, Pérez-Pé R, Muño-Blanco T. Melatonin in sperm biology: Breaking paradigms. Reprod Domest Anim. 2014;49(s4):11–21.
 24. Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. J Pineal Res. 2010;48(1):39–46.



25. Alonso-Vale MIC, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva CDN, Peres SB, Cipolla-Neto J, et al. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J Pineal Res.* 2008;45(4):422–9.
26. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(4):865–7.
27. Vasconcelos Franco JS, Chaveiro A, Góis A, Moreira da Silva F. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(10):787–93.
28. Balao Da Silva CM, Macías-García B, Miró-Morán A, González-Fernández L, Morillo-Rodríguez A, Ortega-Ferrusola C, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *J Pineal Res.* 2011;51(2):172–9.
29. Borg DC. Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. In: *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage.* Boston, MA: Birkhäuser Boston; 1993. p. 12–53.
30. Sikka SC. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology Andrology. *J Androl.* 2004;25(1):5–18.
31. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl.* 2002;23(3):400–9.
32. Rodrigues MB. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe. *Biochem Physiol Open Access* [Internet]. 2015;04(02):0–5. Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/an-efficient-technique-to-detect-sperm-reactive-oxygen-species-the-cellrox-deep-red-fluorescent-probe-2168-9652-1000157.php?aid=54579>
33. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology.* 2005;63(5):1354–65.
34. Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* [Internet]. 1995;368(1):73–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2895%2900603-7>



35. Ortega AM, Izquierdo AC, Gómez JJH, Olivares-Corichi IM, Torres VMM, De Jesus Valencia Mendez J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*. 2003;28(12).
36. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*. 2000;62(1–3):23–53.
37. Ball B a, Vo A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *J Androl*. 2002;23(2):259–69.
38. Hinrichs K. In Vitro Production of Equine Embryos : State of the Art. 2010;45:3–8.
39. Foss R, Ortis H, Hinrichs K. Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. *Equine Vet J* [Internet]. 2013;45(S45):39–43. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.12159/full>
40. Palma GA. Biotecnología de la reproducción. [Internet]. Segunda. Palma G, editor. Córdoba Argentina: INTA; 2001 [cited 2017 Nov 5]. 668 p. Available from: [#v=onepage&q=biotecnología de la reproducción gustavo palma&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=zmHbayu_hfIC&printsec=frontcover&dq=biotecnología+de+la+reproducción+gustavo+palma&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjmrmpVqfXAhVJ8CYKHTMcACAQ6AEIJDA)
41. Larsson B. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility ? *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2000;327–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000890>
42. Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko S, Hinrichs K. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro- matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen – thawed spermatozoa. 2002;455–65.
43. Podestá TJM. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE DILUYENTES DE CONGELACIÓN DE SEMEN SOBRE LA CAPACIDAD DE UNIÓN DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS A ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS BOVINOS [Internet]. Universidad Austral de Chile; 2012. Available from: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fvm912e/doc/fvm912e.pdf>
44. Drobnisf Z. and Subfertile Spermatozoa : 1995;16.
45. A. R. Fazeli, W. Steenweg, M. M. Bevers, J van den Broek, V. Bracher JP



- and BC. relation between stallion sperm bending to homologous hemizonae and fertility. 1995;(95):751–60. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X95002546>
46. FR 32. FERTILIZACIÓN in vitro HETERÓLOGA EN BÚFALOS Pedro Bastidas, Adriana Fernández y Juan Trocóniz Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Apartado Postal 4563 Mar. 1997;5:415–6.
 47. Alvarenga MA, Jr GES. Penetration off zona -free. 2001;(01).
 48. Hawk HW, Wall RJ. Improved yield of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes. 1994;1585–94.
 49. Thomson Gale (Firm) JL, Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. División de Investigación. AA, González Villalobos DM. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Rev Científica. 2009;19(4):382–9.
 50. Sánchez A, Garrido D. Evaluation of a Simplified Hypoosmotic Swelling Test in Fresh and Chilled Canine Semen. redalyc. 2013;
 51. Maxwell WMC, Stojanov T. Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Antioxidants. 2006;
 52. Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology. 1997;48(97):185–92.
 53. J.Braun, S.Hochi, N.Oguri, K.Satao FT-B. Effect of different Protein Supplements on Motility and Plasma Membrane Integrity of Frozen - Thawed Stallion Spermatozoa. Cryobiology. 1995;32:487–92.
 54. Dowsett KF, Knott LM. The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology. 1996;46(3):397–412.
 55. Lavara F, Lavara R, Moce E, Castro V De. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? 2005;64:1130–41.
 56. Neild D, Chaves G, F M, Mora N, Beconi M, Agiiero A. ELSEVIER HYPOOSMOTIC TEST IN EQUINE SPERMATOZOA Theriogenology. 1999;(10):721–7.



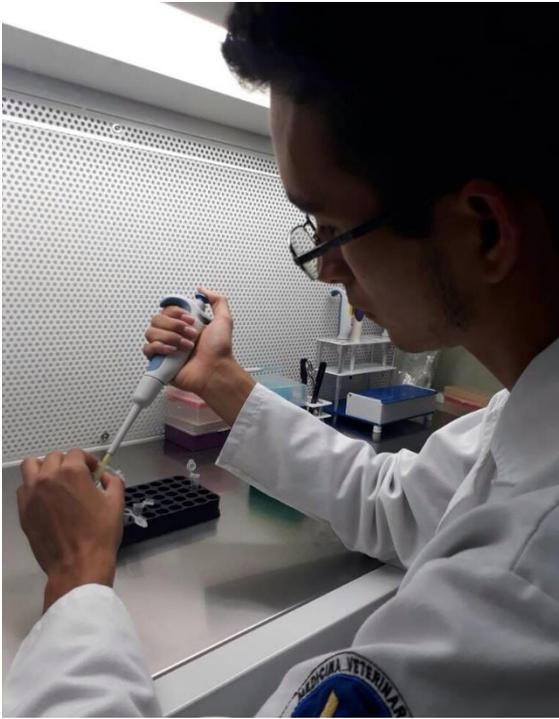
57. Natalia Giraldo. , Juan Esteban Correa Villegas NVA. Evaluación del efecto de la refrigeración Sobre la calidad del semen equino Evaluation of the effect of the refrigeration on. redaluc [Internet]. 2006;10. Available from: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/212>
58. Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Agu A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. 2000;355:351–5.
59. Gibb Z, Aitken RJ. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage : The Stallion as a Model. 2016;2016.
60. Antolín Morillo Rodríguez. Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. Univesidad de Extremadura; 2013.
61. Hauser R, Yavetz H, Paz GF, Homonnai ZT, Amit A, Lessing JB. The Predictive Fertilization Value of the Hypoosmotic Swelling Test (HOST) for Fresh and Cryopreserved Sperm. 1992;9(3).
62. Deep C, Fluorescent R, Bianchi M, Alves R, Furugen A, Andrade C De, et al. Biochemistry & Physiology : Open Access An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species : The. 2015;4(2).
63. Pradieé J, Sánchez-Calabuig MJ, Castaño C, O'Brien E, Estes MC, Beltrán-Breña P, et al. Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). Theriogenology. 2018;108:314–20.
64. A NG, A RG, B JJG, C FM, C AV, A ERSR. Assessment of semen quality , sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). 2010;848–59.
65. S MJ, Pradie J. Theriogenology Fertilizing capacity of vitri fi ed epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). 2018;108:314–20.
66. Roth TL, Bush LM, Wildt DE, Weiss RB, Al RET. Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*) Spermatozoa Are Functionally Competent in a Heterologous Bovine In Vitro Fertilization System after Cryopreservation on Dry Ice , in a Dry Shipper , or over Liquid Nitrogen Vapor 1. 2018;498(June):493–8.

8. ANEXOS

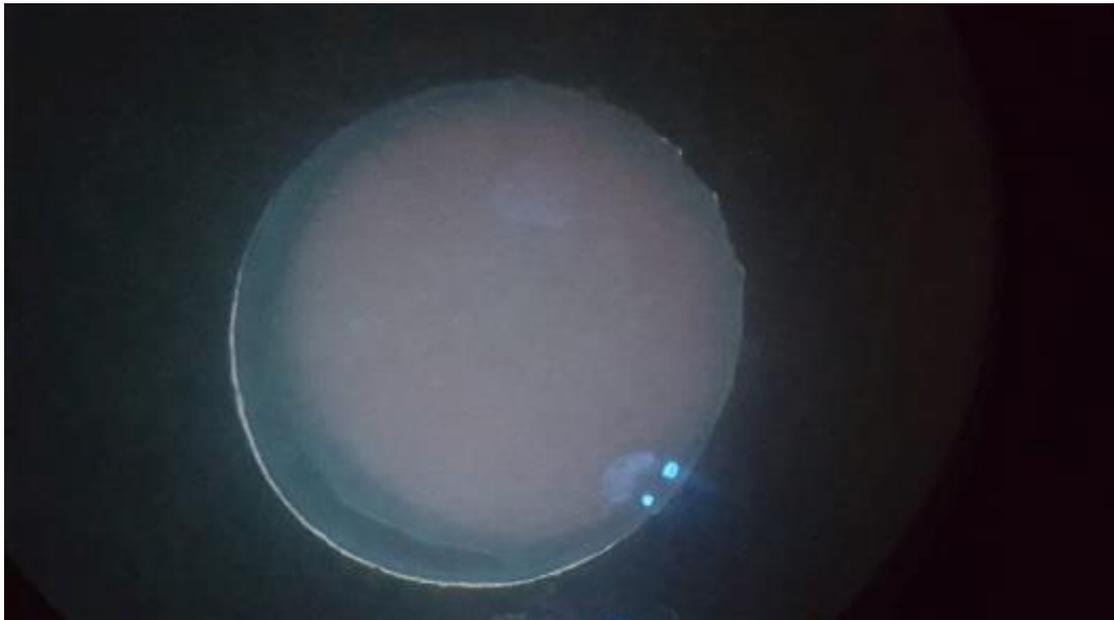
Colecta



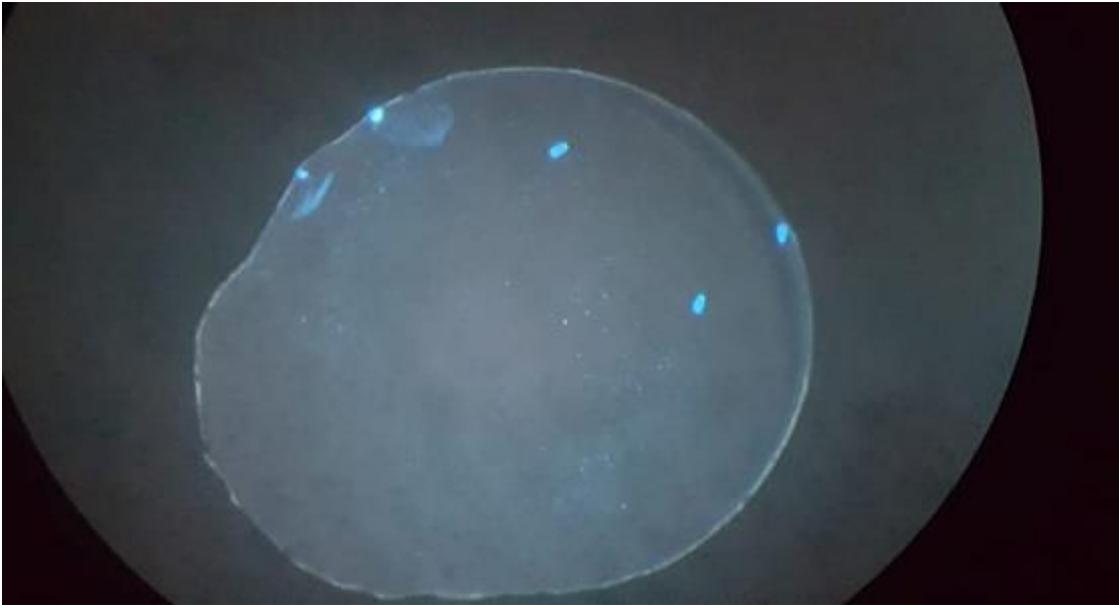
Procesamiento



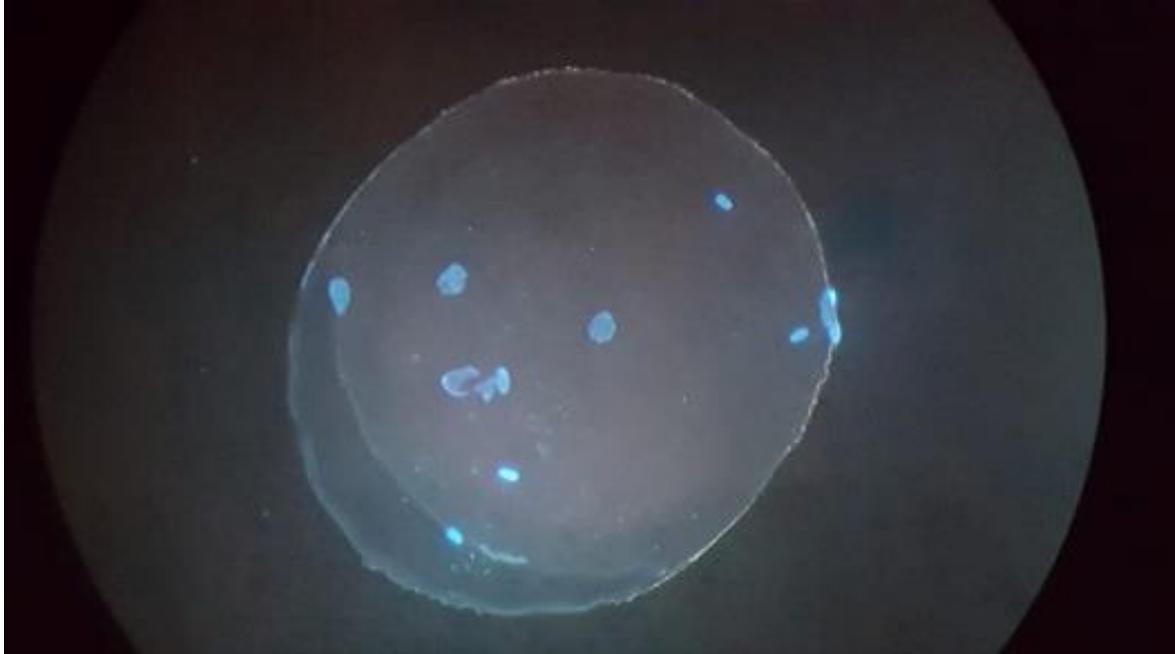
FIV heteróloga



- Bound

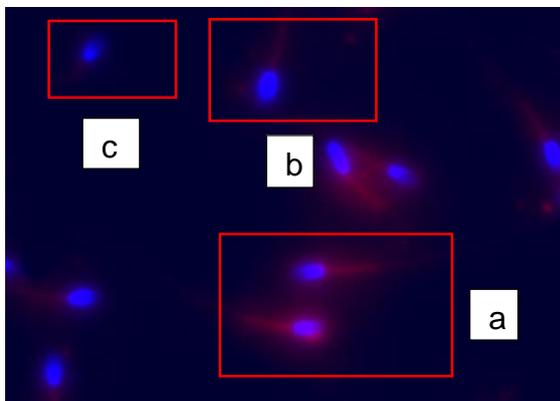


- Penetración y poliespermia



- Pronúcleos 18 h y 24 horas

Estrés Oxidativo



- Estrés oxidativo, espermatozoides equinos observados bajo microscopio de fluorescencia, a) estrés intenso, b) estrés moderado, c) sin estrés.