

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad
espermática de caballos Cuarto de Milla en el norte de México.

Por:

Antonio Velazquez Monroy

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad
espermática de caballos Cuarto de Milla en el norte de México.

Por:

ANTONIO VELAZQUEZ MONROY

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Dr. Oscar Ángel García
Presidente

Aprobada por:

Dra. Viridiana Contreras Villarreal
Vocal

Dra. Leticia Romana Gaytan Alemán
Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva
Vocal Suplente

M.C JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad
espermática de caballos Cuarto de Milla en el norte de México.

Por:

ANTONIO VELAZQUEZ MONROY

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

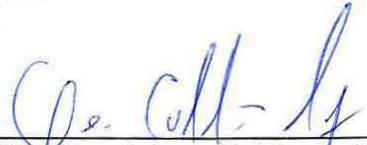
Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Oscar Ángel García
Asesor Principal



Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino
Co-asesor



Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyva
Co-asesor



M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, Junio 2022

AGRADECIMIENTOS

A DIOS le agradezco por haberme conservado con vida y haberme permitido terminar este sueño de convertirme en todo un profesionista. Por la salud que me ha permitido conservar y le pido que me preste más tiempo de vida para disfrutar de mi familia y mi profesión.

A MI ALMA TERRA MATER gracias por haberme permitido formar como profesionista, yo te prometo llevarte siempre en mi corazón y destacar en mi vida profesional.

A mis padres Juan Velazquez González y María Elena Monroy Cruz por el apoyo incondicional que me brindaron para concluir una etapa de mi formación profesional.

A mis hermanos Juan Manuel, Beatriz, Rafael y Minerva Velazquez Monroy por ser un ejemplo a seguir y por creer siempre en mí.

A mi asesor de Tesis al Doctor Oscar Ángel García por apoyarme y ser un gran ejemplo y amigo.

A el MVZ Luis Alan Nevárez Olgín por brindarme todo su apoyo, y por sus conocimientos en el transcurso del proyecto y por ser una parte importante en la realización de este trabajo.

Al dueño Sr. Abelardo Gallegos de Centro de Reproducción Equina los Potrillos y también a todas las personas que de alguna u otra manera brindaron su apoyo en cualquiera de las etapas de este trabajo.

A mis compañeros y amigos; Said Hernández, Alejandro García, Heriberto Guzmán, Pedro Torres, Adrián Tolentino, Ilse Rojas, por permitirme tomar lo mejor de cada uno, por brindarme la mano y otorgarme su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres Juan Velazquez González y María Elena Monroy Cruz les dedico mi tesis por ser mis pilares siempre, por sus consejos, tiempo, su amor incondicional y por su apoyo durante mi carrera.

A mis hermanos Juan Manuel, Beatriz, Rafael y Minerva, por ser un ejemplo a seguir y por esos tiempos de reflexión y convivencia familiar

A toda mi familia porque también a formado parte de mi trayectoria y contribuido a que mis sueños se realicen.

Dedico este trabajo a mi alma mater por su cobijo dentro de sus aulas y los grandes conocimientos que en ella adquirí y ser parte de su historia

Por último, dedico este trabajo a todos los maestros que desde mi infancia pusieron en mi uno a uno sus conocimientos por lo cual son una parte muy importan de mi formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	vii
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	3
1.2 OBJETIVO	3
II REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Anatomía del macho	4
2.2 Órganos reproductores internos	5
2.2.1 Testículos.....	5
2.2.2 Epidídimo	6
2.2.3 Conducto deferente.....	6
2.2.4 Glándulas sexuales accesorias.....	6
2.2.5 Uretra.....	7
2.3 Órganos reproductores externos	7
2.3.1 Escroto	7
2.3.2 Pene	8
2.3.1 Prepucio	9
2.4 Espermatogénesis	9
2.5 Fases de la espermatogénesis	10
2.5.1 La fase proliferativa	11
2.5.2 La fase meiótica.....	11
2.5.3 La fase de diferenciación o fase espermatogénica.....	11
2.5.4 Espermiación.....	11
2.6 Pubertad y estacionalidad reproductiva	12
2.7 Estacionalidad Reproductiva	12
2.7.1 Estacionalidad en el Macho	13
2.8 Evaluación del Semen	14

2.8.1 Evaluación macroscópica del semen	15
2.8.2 Evaluación microscópica del semen	16
2.3 Métodos de Obtención de Semen	18
2.3.1 Vagina artificial.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Lugar de estudio	19
3.2 Recolección de semen	19
3.3 Evaluación seminal	23
3.3. 1 Determinación de volúmenes eyaculatorios libres de gel.....	23
3.3.2 Determinación de la concentración espermática.....	23
3.3.3 Determinación de la motilidad espermática	24
IV RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN.....	26
V CONCLUSIONES	27
VI LITERATURA CITADA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad espermática de caballos Cuartos de Milla en el norte de México.	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tracto reproductivo del macho equino vista de disección sagital.....	4
Figura 2. El sistema tubular del testículo.....	5
Figura 3 Esquema de la relación de las glándulas accesorias con respecto al hueso de la pelvis	7
Figura 4 Estructuras del pene y el prepucio del semental.....	9
Figura 5 Fases de la espermatogénesis: espermacitogénesis, espermatidogénesis, espermiogénesis, espermiación.....	12
Figura 6 Yegua en celo dentro del chut para estimular al semental.....	20
Figura 7 Vagina artificial tipo Missouri.	20
Figura 8 Semental olfateando a yegua.....	21
Figura 9 Lavado y secado del pene del semental.....	22
Figura 10 Semental montado en el dummy y operario colectando con vagina artificial tipo Missouri.	22
Figura 11 Filtrado del eyaculado para la eliminación de gel e impurezas y medición de volumen.....	23
Figura 12 Fotómetro SDM 1 para análisis de la concentración de semen.....	24
Figura 13 Evaluación de la motilidad espermática, utilizando una termoplatina para mantener las laminillas temperadas a 37°C.....	24

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad espermática de caballos Cuarto de Milla en el norte de México. El presente estudio se llevó a cabo en el norte de México. Se utilizaron 5 sementales a los que se determinó la calidad seminal (volumen, motilidad, concentración) en base a registros del año 2020 al 2022. El promedio general en cuanto a la concentración ($114 \times 10^6/\text{ml}$), volumen (39.3 ± 2.2), motilidad (78 ± 1.1) no difirió ($P > 0.05$) entre las épocas (invierno, primavera, verano) del año. Los resultados del presente estudio demuestran que la época del año no afecta la calidad espermática. En conclusión, la época del año no tuvo un efecto sobre el volumen, concentración y motilidad espermática en caballos Cuarto de Milla.

Palabras claves: Concentración Espermática, Volumen del Eyaculado, motilidad, Época, Sementales.

I INTRODUCCIÓN

La población de equinos en México es alrededor de 6,257,978 cabezas, la crianza de estos animales tiene diferente fin zootécnico, como la reproducción, deporte, charrería, trabajo, etc. Lo anterior, va de acuerdo con el tamaño, peso, y complexión física lo cual determina el trabajo que desempeñan estos animales (Vázquez *et al.*, 2017). En la cría ecuestre, el semental representa el mayor valor económico y responsabilidad en el mejoramiento genético del criadero, por el hecho de ser el único exigido para cubrir un gran número de yeguas. De esta forma, la eficiencia reproductiva del criadero depende de la fertilidad del garañón ya sea a través de monta natural o por la inseminación artificial (IA) con semen fresco, refrigerado o congelado (Andrade *et al.*, 2011).

La evaluación en sementales y machos jóvenes candidatos a la cría para la difusión de razas a nivel local y regional en crianza natural y/o con el uso de reproducción asistida (Vázquez *et al.*, 2017), con las características genotípicas deseadas, lo cual permitirá el nacimiento de un potro con fenotipo y habilidades deportivas y carácter escogidos por el criador (Vélez, 2016).

La evaluación del potencial de fertilidad del macho se basa en el análisis de las características espermáticas básicas (concentración, motilidad y morfología). Así, el estudio de la morfología espermática es un elemento fundamental en el análisis seminal, sin embargo, esta ha sido sesgado por las diversas técnicas que son utilizadas en la evaluación seminal (Gacem *et al.*, 2021). Lo anterior, es fundamental en la determinación de la capacidad fecundante del semen para lograr optimizar los resultados de las tecnologías de reproducción asistida que se aplican en los programas de crianza en la especie equina (Betancur y Cadavid, 2013).

Por otra parte, para determinar la capacidad reproductiva del semental, es primordial conocer la anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho principalmente los testículos, epidídimos, conductos deferentes, ampollas deferentes, uretra, glándulas accesorias (próstata, glándulas vesiculares y glándulas bulbouretrales), pene y prepucio, los cuales presentan diferencias

anatómicas (Figura 1) entre las especies (Galina y Valencia, 2008). Por lo anterior, en la actualidad se han desarrollado diversos métodos para llevar a cabo el análisis de la calidad seminal, a través de nuevos métodos y técnicas. Por ejemplo, el sistema de análisis de semen asistido por computador (CASA) permite que la evaluación espermática ya sea de manera objetiva y precisa, incluyendo la determinación de nuevas variables en la motilidad espermática (Betancur y Cadavid, 2013).

1.1 HIPÓTESIS

La época del año no afecta el volumen, concentración y motilidad espermática del de sementales Cuarto de Milla en el norte de México

1.2 OBJETIVO

Determinar el efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad espermática de caballos Cuarto de Milla en el norte de México.

II REVISION DE LITERATURA

2.1 Anatomía del macho

En el macho el examen reproductivo no solo debe de evaluar las características del semen, sino también el estado físico general del garañón y la habilidad y condición para llevar a cabo la monta (Porta *et al.*, 2009). El conocer cómo funciona cada uno de los órganos del sistema reproductor del macho nos lleva a optimizar al garañón y por ende tener éxito en el ámbito reproductivo (Giraldo *et al.*, 2006; Betancur y Cadavid., 2013).

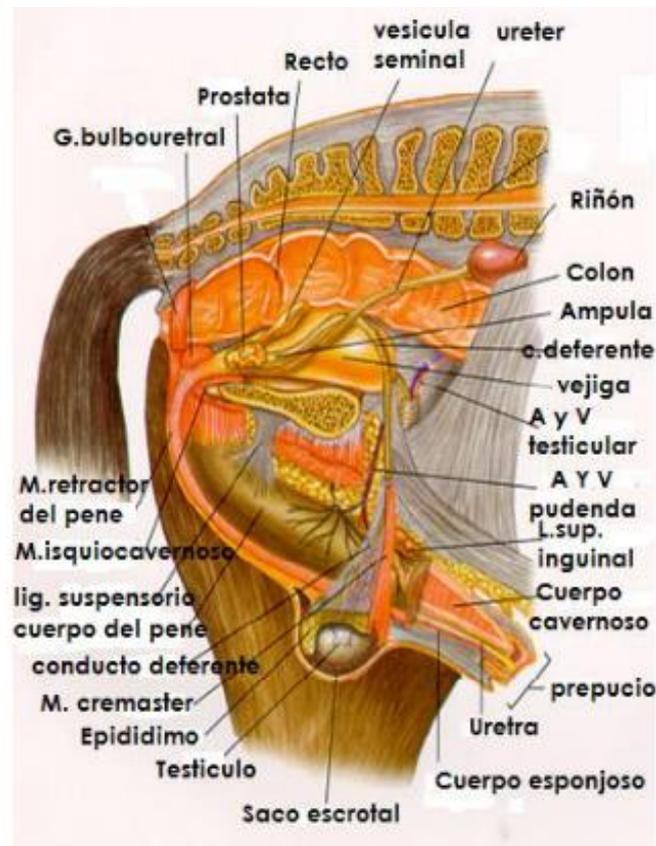


Figura 1 Tracto reproductivo del macho equino vista de disección sagital (Luna, 2019).

2.2 Órganos reproductores internos

2.2.1 Testículos

El testículo es la gónada y el sitio donde se producen los espermatozoides y además poseen una intensa actividad endócrina (Boeta *et al.*, 2018), de las hormonas masculinas como la testosterona. Los testículos tienen una forma ovoide, el tamaño del testículo puede variar de acuerdo a la edad y raza del semental. Este va desde 80 a 140 mm. de longitud, y de 50 a 80 mm. de ancho, y pueden pesar 225 g. Las bolsas que envuelven al testículo son la túnica albugínea, enseguida se encuentra la túnica vaginal, recubren al testículo y al cordón espermático. El músculo cremaster se inserta en el borde dorsal del testículo (Galina y Valencia, 2008; Porta *et al.*, 2009).

Los túbulos seminíferos se unen y convergen en el borde de la unión del testículo, aquí es donde varios conductos atraviesan la albugínea y penetran en la cabeza del epidídimo. La arteria espermática, es una rama de la aorta posterior, lleva sangre al testículo y sale en forma de vena espermática. El testículo está inervado por el nervio espermático, cuyo origen es parasimpático (Hafez, 2000).

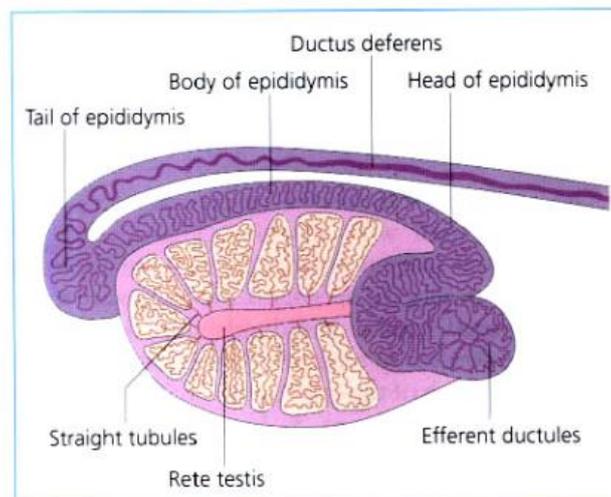


Figura 2. El sistema tubular del testículo (Tomado de Blanc *et al.*, 2003)

2.2.2 Epidídimo

El epidídimo está dividido en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Los túbulos seminíferos (alrededor de 13-15) se reúnen al atravesar la túnica albugínea en un conducto único para formar la cabeza. El cuerpo está adherido a la parte dorsal del testículo. La cola se localiza en la extremidad inferior del testículo que continúa en el conducto deferente, el cual se incorpora al cordón espermático junto con los vasos sanguíneos y linfáticos del testículo, para llevar el semen hacia la uretra (figura 2) (Porta *et al.*, 2009). La función del epidídimo es la de almacenar, madurar y transportar los espermatozoides hacia los conductos deferentes (Porta *et al.*, 2009).

2.2.3 Conducto deferente

Es una continuación de la cola del epidídimo donde los espermatozoides se transportan desde la cola del epidídimo hasta la uretra a través del conducto deferente, es un conducto pequeño que se encuentra rodeado de una capa muscular (Blanc *et al.*, 2003). La luz de este conducto es de 4-5mm es constante, aunque la pared se engruesa para formar la ampolla unos 18mm antes de la entrada a la uretra, esto se debe a la presencia de numerosas glándulas en la vesícula. La unión de la uretra es conjunta con los conductos excretores de las vesículas seminales (Hafez, 2000).

2.2.4 Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias son: 2 glándulas vesiculares, próstata y 2 glándulas bulbo uretrales. Las glándulas vesiculares son sacos alargados y huecos, miden de 15 a 20 cm. de largo y 5 cm. de diámetro. La próstata es una glándula simple, nodular, con dos lóbulos estrechos, conectada por un istmo delgado.

Las glándulas bulbo uretrales se encuentran en cada lado de la uretra pélvica cerca del arco isquiático (Blanc *et al.*, 2003).

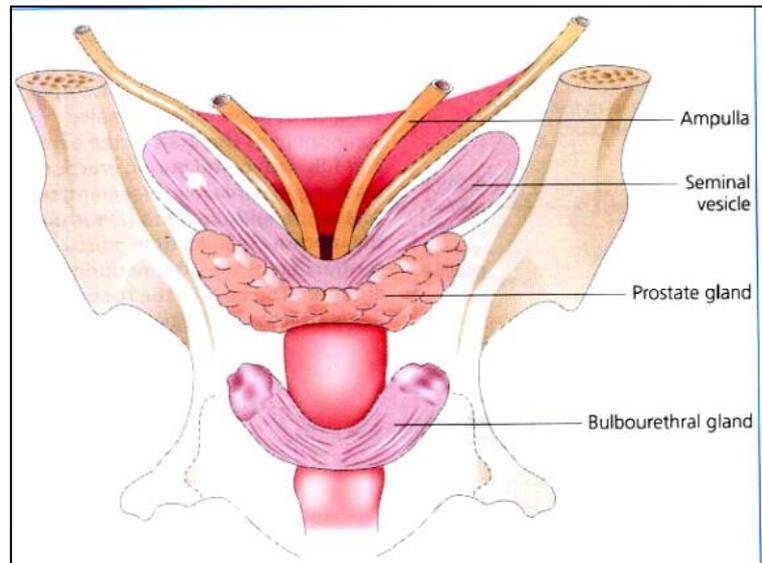


Figura 3 Esquema de la relación de las glándulas accesorias con respecto al hueso de la pelvis (Blanc *et al.*, 2003).

2.2.5 Uretra

La uretra es un tubo que se extiende de la vejiga hacia la última porción del pene la porción pélvica de la uretra está cubierta por un músculo delgado llamado músculo uretral, que se contrae vigorosamente durante la eyaculación. La uretra termina en una extensión libre llamada proceso uretral. La uretra dentro del pene se encuentra rodeada por el cuerpo esponjoso, que es un área cavernosa de tejido eréctil. La uretra sirve como canal excretorio de la orina y el semen (Boeta *et al.*, 2018).

2.3 Órganos reproductores externos

2.3.1 Escroto

El escroto es una bolsa de piel conformado por dos sacos divididos por un rafe central. Está conformado por cuatro capas, la capa exterior es la piel que es más delgada que el resto del cuerpo. Debajo de la piel se encuentra la túnica dartos, está formada por músculo liso y tejido conectivo. La tercera capa o fascia escrotal está formada por tejido conectivo laxo, esta capa proporciona una gran movilidad al testículo dentro del escroto. La capa más interna es la túnica vaginal, es un saco membranoso que se extiende desde la cavidad abdominal y pasa a través del anillo inguinal hasta el final del escroto. Parte de esta membrana cubre parte del testículo y el epidídimo, también es parte del cordón espermático. El escroto se encarga de revestir y proteger a los testículos, epidídimo, cordón espermático

y músculo cremaster; también juega un papel vital en la termorregulación gonadal (Jaramillo, 2007).

El sistema circulatorio del escroto está constituido por ramas de la arteria y vena pudenda externa. La linfa es dirigida hacia el nódulo linfático inguinal superficial. La inervación se deriva de las ramas ventrales de los nervios lumbares segundo y tercero (Galina y Valencia, 2008).

2.3.2 Pene

El pene del caballo mide alrededor de 50 cm. de largo y de 3 a 6 cm. de diámetro. Durante la erección el pene dobla su tamaño, tiene forma cilíndrica y ligeramente comprimido lateralmente. Este se divide en tres porciones: la raíz que se encuentra adherida al hueso de la pelvis; el cuerpo es la porción principal del pene; y el glande que es su parte terminal (Hafez, 2000).

La raíz del pene está adherida firmemente al arco isquiático gracias a dos fuertes ligamentos crurales; el pene del caballo es del tipo músculo cavernoso, debido a que el tejido eréctil está compuesto predominantemente de espacios cavernoso en lugar de travéculas de tejido fibroso (como en el caso del pene fibroelástico del toro) (Hafez, 2000; Galina y Valencia, 2008).

El pene está compuesto de tres cuerpos cavernosos: el cuerpo cavernoso del pene, el cuerpo esponjoso, y el cuerpo esponjoso del glande. El cuerpo cavernoso del pene se extiende a todo lo largo del cuerpo del pene y está cubierto por la gruesa túnica albugínea. La erección precopulatoria del caballo, se debe principalmente a la acumulación de sangre, provocada por la dilatación de las arterias, vasos y nervios asociados al pene que irrigan los cuerpos cavernosos, causada por la excitación sexual (Jaramillo, 2007; Brinsko *et al.*, 2011)

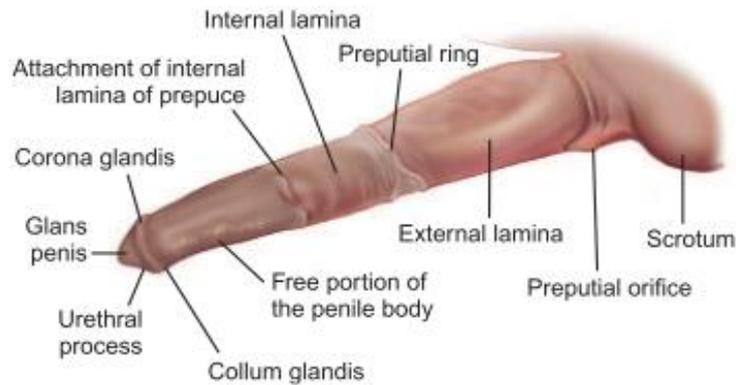


Figura 4 Estructuras del pene y el prepucio del semental (Brinsko; *et al.*, 2011)

2.3.1 Prepucio

El prepucio cubre y protege el pene no erecto a diferencia de otras especies el prepucio del caballo se dobla alrededor del pene no erecto formando dos sacos distintivos; un prepucio externo y otro interno. El prepucio externo consiste de una lámina interna y externa que convergen para originar el orificio prepucial. Únicamente la lámina externa del prepucio externo está expuesta cuando el pene no está extendido, el prepucio externo del caballo es igual al de las otras especies domésticas; sin embargo, su lámina interna no se adhiere directamente al pene del caballo, si no que continúa como el prepucio interno, que está compuesto también por una lámina interna y otra externa, que forman el anillo prepucial. El prepucio interno separa la cavidad prepucial en dos compartimientos separados (Brinsko *et al.*, 2011).

2.4 Espermatogénesis

Es el proceso cronológicamente organizado que involucra la multiplicación y diferenciación de las células germinales (espermatozonias) localizadas en el epitelio seminífero del testículo, que resulta en la formación de células especializadas llamadas “espermatozoides” que constituyen el gameto del macho (Galina y Valencia, 2008; Boeta *et al.*, 2018).

Los espermatozoides son células extremadamente especializadas y experimentan cambios genéticos, moleculares y fisiológicos que no se observan en otras células, es una célula haploide altamente diferenciada, que tiene por función transportar el genoma del macho y fusionarse con el gameto de la hembra (el ovocito), para dar lugar a un nuevo individuo diploide y propagar así

la especie. Desde el punto de vista evolutivo, los espermatozoides constituyen un modelo celular de interés excepcional, ya que se encuentran entre las células más divergentes de los seres vivos, presentando tamaños y formas muy variadas (Rodríguez, 2018 Sánchez, 2019).

En todos los mamíferos la espermatogénesis depende del eje hipotálamo-hipófisis- testículo, en donde se involucran la acción de las gonadotropinas, el mecanismo de feedback de los esteroides, las proteínas y la modulación paracrina y autocrina de muchas sustancias y factores de crecimiento. Por otro lado la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina, de las hormonas de la pituitaria anterior, LH, FSH y las hormonas testiculares como los andrógenos y la inhibina. La testosterona es muy importante ya que mantiene y restaura el proceso de espermatogénesis en los testículos de animales adultos, mientras que la LH estimula la síntesis androgénica en las células de Leydig de los testículos estos andrógenos regulan localmente la producción espermática y realizan una retroacción negativa hacia el hipotálamo para controlar la liberación de GnRH y así la expansión de la espermatogénesis en la pubertad (Blanc *et al.*, 2003; Galina y Valencia, 2008)(Blanc et al. 2003).

La espermatogonia juega un papel fundamental en la regulación de la espermatogénesis, sin embargo, sus detalles siguen siendo relativamente oscuros en especies no roedores. El testículo equino contiene aproximadamente un 100% más de espermatogonias en el verano que en el invierno y parece ser un buen modelo para identificar los componentes flexibles de la espermatogénesis que causan cambios estacionales en la producción diaria de espermatozoides en el semental, las diferencias estacionales son mayores en el número de espermatogonias que en la producción de espermatozoides (Brinsko *et al.*, 2011).

2.5 Fases de la espermatogénesis

La espermatogénesis se puede dividir en espermatocitogénesis, espermatidogénesis (meiosis), espermiogénesis y Espermiación (Vera, 2018), en el caballo, esta secuencia dura aproximadamente de 55 a 57 días (Boeta *et al.*, 2018).

2.5.1 La fase proliferativa

Espermatocitogénesis es un ciclo de proliferación de las espermatogonias por medio de la mitosis para producir espermatocitos primarios y al mismo tiempo generar nuevamente un número propio y continuar con la línea de células germinales, con una duración de 19.5 días en los caballos (garañones) (Galina y Valencia, 2008).

2.5.2 La fase meiótica

Espermatidogénesis es la segunda fase donde comienza la división meiótica, mediante la cual el espermatocito primario diploide va a originar dos espermatocitos secundarios donde ocurren los cambios de material genético de los pares de cromosomas las fases de esta división son iguales a los que ocurren en la meiosis de la hembra. Durante este periodo no solo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticas sino también los cromosomas sexuales. Se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. En la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se produce dos espermatidas originando las espermatides haploides, que son células de mayor tamaño y más diferenciadas teniendo una duración de 19.4 días (Boeta *et al.*, 2018).

2.5.3 La fase de diferenciación o fase espermatogénica

Espermiogénesis es la porción de la espermatogénesis que implica la maduración y transformación estructuralmente de las espermatidas redondas en espermatozoides que poseen una cabeza aplanada con el núcleo condensado y una vesícula con enzimas especializadas y la cola que es necesaria para la motilidad. Estos cambios ocurren cuando las espermatidas están en contacto con las células de Sertoli, esta fase no involucra divisiones celulares y tiene una duración de 18.6 días (Hafez, 2000; Galina y Valencia, 2008).

2.5.4 Espermiación

En esta última fase se rompen las uniones de la espermatida madura y las células de Sertoli quedando liberada al lumen de los túbulos seminíferos, donde finalmente ocurre la maduración y adquieren la habilidad de fertilización, proceso que dura de 9 a 14 días. Es entonces que los espermatozoides presentes en el eyaculado se han producido de los eventos ocurridos en 2 meses anteriores que

influyeron en transporte y maduración de los espermatozoides a través del epidídimo (Luna, 2019; Sánchez, 2019).

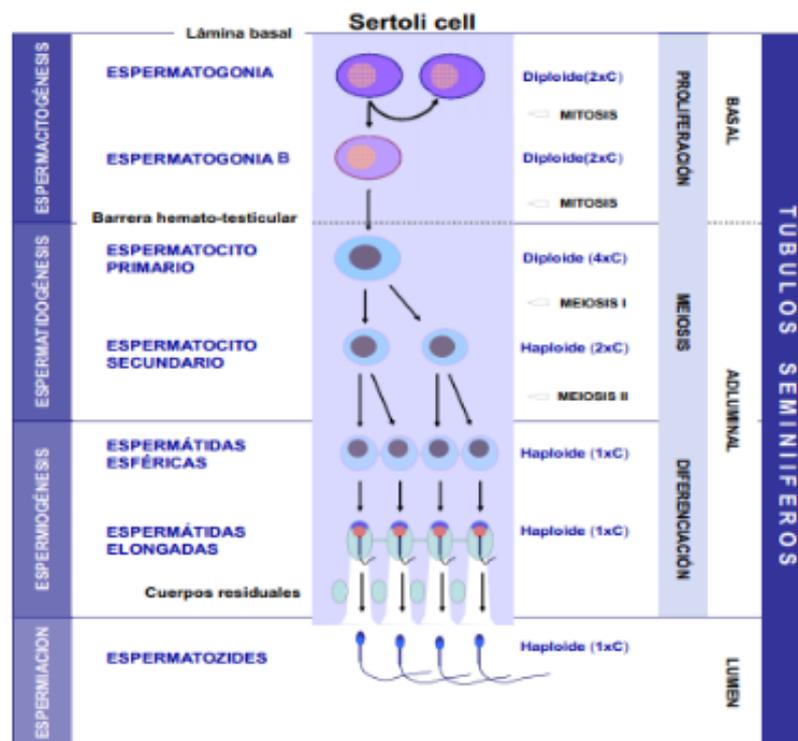


Figura 5 Fases de la espermatogénesis: espermatogénesis, espermatidogénesis, espermiogénesis, espermiación (Luna, 2019).

2.6 Pubertad y estacionalidad reproductiva

La pubertad marca el inicio de la vida reproductiva del animal, cuando es capaz de liberar gametos viables en el macho durante la primera eyaculación con espermatozoides viables lo que permite integrar al individuo a su ciclo productivo, la edad en que los caballos alcanzan la pubertad varía de los 12 a los 24 meses dependiendo de raza unas son más precoces que otras (Boeta *et al.*, 2018), estado nutricional y la estación de nacimiento pueden influenciar éste proceso (Jaramillo, 2007). La estacionalidad es una característica de adaptación que han desarrollado algunas especies para hacer más eficiente la reproducción y la supervivencia de las crías (Blanc *et al.*, 2003; Boeta *et al.*, 2018).

2.7 Estacionalidad Reproductiva

Las yeguas presentan particularidades en la fisiología reproductiva, la principal es que es poliestrica estacional de fotoperiodo largo, presenta ciclos de duración variable del ciclo estral en las yeguas es de aproximadamente 21 ± 3 días, se

describe comúnmente como una combinación de una fase folicular, o celo donde la yegua es receptiva al semental y comprende de 5-7 días, este es muy variable ya que al final de la etapa reproductiva la duración es de 7 a 12 días y alrededor del solsticio de verano es más corto durando de 3 a 4 días, y una fase lútea o diestro donde no existe aceptación y este finaliza con la regresión del cuerpo lúteo debido a la liberación de prostaglandinas (PGF 2α) en el endometrio, con una duración de 14-15 días (Boeta *et al.*, 2018).

Generalmente, los cambios en las características seminales del caballo y su comportamiento sexual, causado por la estación, coinciden con la estación reproductiva de la yegua. Los principales factores que determinan la producción espermática son la época del año, la talla testicular y la frecuencia de eyaculación (Brinsko *et al.*, 2011) señalaron variaciones en las características seminales del caballo, por los efectos estacionales con variaciones en el número de espermatogonias, espermatoцитos y producción diaria de semen (Andrade *et al.*, 2011).

Como resultado en el hemisferio norte, las concentraciones de hormonas sexuales en plasma periférico muestran un patrón estacional definido con un aumento que comienza en febrero, máximo en abril y mayo y valores bajos nuevamente en el período de octubre a noviembre (Luna, 2019).

2.7.1 Estacionalidad en el Macho

El macho es menos afectado que la hembra por los cambios propios de cada época del año, ya que su función reproductiva no necesariamente se interrumpe durante la época de anestro o de descanso sexual, aunque la producción de las hormonas reproductivas, el tamaño y el tono testicular, la libido, las características cualitativas y cuantitativas del eyaculado y la fertilidad de los espermatozoides pueden verse disminuidas. El nivel de afectación depende del grado de estacionalidad de la raza y de la latitud. Hay que separar, por último, los efectos del fotoperiodo, de los nutricionales que también varían con la época del año (Boeta *et al.*, 2018).

Los garañones experimentan cambios fisiológicos durante la temporada no reproductiva que incluyen disminución en el tamaño testicular y disminución de

la concentración de la testosterona en suero (Rodríguez, 2018) y se ha determinado que influye en la calidad seminal (Rua *et al.*, 2016).

2.8 Evaluación del Semen

Es importante señalar que, existe un alto grado de variabilidad en la calidad del semen entre los machos e incluso entre los eyaculados de un mismo animal (Cabrera *et al.*, 2014), la evaluación del semen equino debe comenzar inmediatamente después de la colecta (Jaramillo, 2007) y los indicadores de la fertilidad del semental son las tasas de gestación y natalidad, pero ambos son retrospectivos y están influenciados por factores independientes de la fertilidad del caballo como son la fertilidad de la hembra y el manejo reproductivo (Cepeda, 2014).

La determinación de las características cualitativas y cuantitativas del semen de aquellos animales que se utilizan o que se van a emplear en la reproducción, es uno de los aspectos fundamentales al evaluar la capacidad reproductiva de los machos (Castro y Chacón, 2016). La evaluación macroscópica del semen comprende la apreciación del volumen, el color, el aspecto, el olor y el pH; mientras que la evaluación microscópica incluye la determinación de la concentración, la motilidad y la morfología espermáticas. Debe efectuarse en condiciones adecuadas de temperatura, entre 37 y 38 °C, el material que se utilice debe encontrarse limpio y seco, y estar a la misma temperatura a la que se mantiene el semen (Boeta *et al.*, 2018).

El espermatozoide de los mamíferos consta de 5 regiones; cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Tienen un núcleo condensado, una membrana plasmática sensible a cambios térmicos y osmóticos y las mitocondrias (Barroso, 2006). La cabeza del espermatozoide está formada por un núcleo, el acrosoma, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El cuello es la unión de la cabeza o pieza intermedia, está formado por capitulum, mitocondrias, centriolo proximal, columnas laminadas que ayudan a la flexibilidad y movimiento. El flagelo ayuda al movimiento y está formado por: pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal, todos estos están formados por el axonema que es la estructura que hace el movimiento. El axonema está formado por micro túbulos (Vélez, 2016; Rodríguez 2018), la

integridad de la membrana plasmática puede ser considerada como un indicador indirecto de la vitalidad de los espermatozoides (Lozano *et al.*, 2011)(Betancur y Cadavid 2013).

2.8.1 Evaluación macroscópica del semen

2.8.1.1 Volumen

Una vez separada la porción espermática del gel obtenido que también es variable, de no presentarse a estar en un volumen bastante elevado. (Hafez, 2000; Cepeda 2014) se procederá a la evaluación macroscópica, la cual provee una información estimada de la concentración y calidad del semen, el volumen; por sí solo no es un factor determinante en la fertilidad, es usado en el cálculo del número total de espermatozoides en el eyaculado. A pesar de que el volumen puede variar de acuerdo a la estación reproductiva así como por el uso como reproductor la media, es de 45 ± 30 ml (Fernando *et al.*, 2011).

El volumen total de la eyaculación del caballo es en promedio de 60 a 70 ml con un rango de entre 30 y 300 ml. El pH del semen equino es ligeramente básico, con un rango de 7.2 a 7.7, y se determina usando un potenciómetro preferentemente en la primera hora después de obtenido el semen. (Miró *et al.*, 2011; Cepeda, 2014).

Son varios los factores que pueden afectar el volumen de semen obtenido en un semental como el individuo, la raza, la edad, la frecuencia de recogida, el nivel de estimulación o la época del año(Brinsko *et al.*, 2011)

El volumen obtenido se evalúa tras la recolección utilizando el mismo recipiente utilizado en la recogida (que consta de un filtro que permita eliminar la fracción gel y la mayor parte de la suciedad) o bien tras filtrarlo y transferirlo a un recipiente escalado y atemperado (Cepeda, 2014); el semen fresco equino tiene una apariencia opaca gris blanquecina y la detección de cambios en el color que puedan ser asociadas a la presencia de detritos, sangre u orina, que pueden afectar severamente la calidad del semen e indicar un desorden en el tracto reproductivo o urinario (Jaramillo, 2007).

2.8.2 Evaluación microscópica del semen

2.8.2.1 Motilidad

En la actualidad, el método más común para determinar la motilidad de los espermatozoides de los sementales es la estimación visual, usando el microscopio (Pérez *et al.*, 2017). La evaluación de la motilidad de los espermatozoides se considera un determinante importante en el semen del semental (Acuña, 2011; Sánchez, 2019) debido a su papel esencial para el transporte del material genético hasta el sitio de la fertilización (Sánchez, 2019).

Existen dos tipos de movimiento espermático, un movimiento activo, propio de los espermatozoides eyaculados y cuya finalidad es avanzar en el tracto reproductor de la hembra (Rodríguez, 2018), el patrón de motilidad progresiva en el caballo no es tan rectilíneo como en otras especies y el porcentaje normal de motilidad progresiva es de 75 %, con un rango de 60 a 95 %. (Ortega, 2011; Sánchez, 2019).

La movilidad espermática es evaluada usando un microscopio óptico de contraste de fase y un ambiente térmico, la muestra se evalúa en función del porcentaje de células en movimiento. Sin embargo, hay varios tipos de movimiento de los espermatozoides (vibratorio, circular, oscilatorio, progresivo lento y rápido), cuyas clasificaciones pueden ser empleadas para las diferentes especies (Betancur y Cadavid, 2013), el sistema CASA es, a partir de entonces, capaz de determinar una serie de variables, incluyendo el número de espermatozoides en movimiento, velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), coeficiente lineal (LIN), coeficiente de rectitud (STR), frecuencia de desplazamiento de la cabeza (BCF), etc. Las variables cinemáticas obtenidas de CASA, que no pueden ser determinadas por el ojo humano, son útiles para fines de investigación, permitiendo, por ejemplo, identificar subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en un eyaculado de semental (Morrell, 1997; Tejerina *et al.*, 2009; Restrepo *et al.*, 2013).

2.8.2.2 Concentración

La concentración espermática es la cantidad de espermatozoides en un volumen establecido, generalmente es de un mililitro. Para determinar la concentración se puede usar el hematocitómetro, también llamado cámara de Neubauer o de Spencer, el espectrofotómetro, el fotocolorímetro, o bien un contador fotoeléctrico de células el densímetro equino® (Animal Reproduction Systems) o el Spermecue® (Minitube), los cuales consisten en sistemas portátiles y rápidos, que tienen como limitante su alto costo, y el hecho de ser precisos solamente con semen fresco (Porta *et al.*, 2009; Betancur y Cadavid, 2013).

Los valores de concentración espermática media fluctúan entre los 150-300 millones/ml con un rango de variación muy amplio (50--800 millones/ml) (Hafez, 2000; Rua *et al.*, 2016), dado que además de proveer información sobre la capacidad fecundante, también es necesario para definir las tasas de dilución, o la cantidad de dosis para la inseminación artificial (Stornelli *et al.*, 2017; Boeta *et al.*, 2018; Gacem *et al.*, 2021).

2.3 Métodos de Obtención de Semen

2.3.1 Vagina artificial

Es el método de elección para la obtención de semen en los machos rumiantes y en el garañón. Consiste en la utilización de un tubo rígido que contiene una válvula, y en cuyo interior se introduce una manga de látex, que se pliega en ambos extremos. La recámara que se forma entre la pared del látex y la pared del tubo se llena con agua caliente a una temperatura de entre 42 y 45 °C, lo que constituye un estímulo para la eyaculación. La obtención de semen se realiza al montar al macho sobre una hembra o un maniquí.

Existen diferentes modelos de vaginas artificiales disponibles para recolectar semen de sementales. Los modelos de Missouri y Colorado en los Estados Unidos, Hannover en Europa, todos estos modelos se basan en el concepto de una vejiga llena de agua caliente/tibia para proporcionar la presión y la temperatura adecuadas para estimular la eyaculación de los sementales (Dalmau, 2012; Vélez, 2016(Dalmau 2012); Alvarenga *et al.*, 2016).

Cuando se tengan preparados tanto a la hembra como al semental, se saca el recipiente colector de semen de la incubadora y se termina de ensamblar la vagina. Se debe revisar que la vagina tenga una temperatura interna de 42 a 45 °C al momento de la colección y con la suficiente presión (Dalmau, 2012). Para la colección del semen se requieren por lo menos tres personas: un manejador de la yegua, otro del semental y un operador de la vagina artificial. Cuando el garañón empieza a eyacular el operador de la vagina puede sentir las pulsaciones en la base del pene, las cuales se asocian con el movimiento característico de la cola, conocido como “bandereo”. La vagina se retira hasta que termine la eyaculación y el pene del animal haya perdido su erección.(Porta *et al.*, 2009)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Reproducción los Potrillos ubicado en el municipio de Cuauhtémoc se localiza en la de latitud norte 28° 25"; longitud oeste 106° 52"; con una altitud de 2,060 msn. (INAFED, 2015). El clima es considerado semiseco y templado con una precipitación media anual de 530 mm/año, y la temperatura media anual es de 18° C, pero alcanza temperaturas de hasta 30°C en temporadas cálidas (primavera y verano) y 10°C en temporadas frías (otoño e invierno)(CONAGUA, 2015).

3.1.1 Animales y su manejo

Se utilizaron 5 sementales de la raza Cuarto de Milla con edades entre 7- 11 años y con buen estado de salud y con un peso vivo de entre 500 -700 kg y una condición corporal de 5 (escala del 1 al 9), los sementales se mantienen alojados en caballerizas de 6 X 12 m donde 50% tienen techo y el resto les sirve para área de sol, con piso de tierra y cama de arena; la alimentación que reciben es a base de alfalfa y concentrado al 14% de PC y agua a libre acceso como lo establece la Organización Mundial de Salud Animal (Sánchez *et al.*, 2015). Además, los sementales se ejercitan diariamente por las mañanas durante 40 minutos en un caminador eléctrico y 3 veces a la semana se sueltan por las tardes en un corral de 40x50 m en el que permanecen 2 horas.

3.2 Recolección de semen

Para la recolección de semen se contó con una yegua en celo, la cual se metió dentro del chut y esta es sujeta por un técnico capacitado para evitar que se asuste a la hora de la presentación con el semental.



Figura 6 Yegua en celo dentro del chut para estimular al semental.

Se utilizó una vagina artificial tipo Missouri de liner de látex con válvula, adaptador de válvula, asa de cuero, acondicionador AV y botella de colección (Dalmau, 2012).



Figura 7 Vagina artificial tipo Missouri.

Una vez armada la vagina artificial, se llenó de agua a 54°C. para obtener una temperatura interna de 45-48°C. o menos. Una vez listos tanto el semental y la yegua se le colocó al interior de la vagina gel lubricante no espermicida.

El proceso de recolección de semen requirió de tres personas, una manejando a la yegua, otra al semental y el que manipula la vagina artificial.

Primero se presentó al semental frente a la yegua para que éste se estimule, después continuó el cortejo, olfateo y mordiscos para luego llevarlo al Dummy.



Figura 8 Semental olfateando a yegua

Una vez erecto el pene se realiza el lavado con agua a temperatura de 35° C aproximadamente y el secado con servilletas, con el fin de obtener el semen libre de impurezas, debe lavarse especialmente la fosa uretral, con agua tibia para eliminar el esmegma y los microorganismos justo antes de la extracción. Es importante evitar el uso de soluciones bactericidas que puedan alterar la flora bacteriana normal del pene (Alvarenga *et al.*, 2016).



Figura 9 Lavado y secado del pene del semental.

Se lleva al semental al dummy de monta, donde el manejador llevaba al caballo en línea recta y una vez que el semental montó al dummy, el operador de la vagina desvió el pene hacia la vagina artificial, se introducía el pene, dejando la vagina paralela al dummy de monta, se revisaban las pulsaciones uretrales y se confirmaba la eyaculación con la observación del “bandereo” de la cola característico (señal de eyaculación) y el operador fue cambiando la posición de la vagina conforme se retraía el pene del semental (Dalmau, 2012).



Figura 10 Semental montado en el dummy y operario colectando con vagina artificial tipo Missouri.

Obtenido el eyaculado se procede a su evaluación macro y microscópicas del semen (motilidad, morfología, concentración) (Castro y Chacón, 2016).

3.3 Evaluación seminal

3.3.1 Determinación de volúmenes eyaculatorios libres de gel

El volumen libre de gel se obtuvo filtrando 2 veces el eyaculado y se midió utilizando cilindros de vidrio graduados con capacidad de 250 ml, obteniendo la muestra del vaso recolector y vertiendo el contenido por la pared del probeta graduada en su totalidad y así poder cuantificar el volumen expresado en mililitros (Restrepo y Restrepo, 2011; Restrepo *et al.*, 2013; Duque *et al.*, 2017).



Figura 11 Filtrado del eyaculado para la eliminación de gel e impurezas y medición de volumen.

3.3.2 Determinación de la concentración espermática

Se evaluó mediante un Fotómetro SDM 1 para análisis de la concentración de semen (Figura 12), se calibró primero con una microcubeta específica para la especie y una vez calibrado, se depositó semen con una pipeta en la microcubeta, que se absorbió por capilaridad, y se colocó en la rejilla del fotómetro. Los valores dados por el fotómetro SDM 1 aparecen directamente como número de partículas contadas por millón en un mililitro de volumen, los resultados de todas las muestras se anotaron en la bitácora (Minitube, s/f).



Figura 12 Fotómetro SDM 1 para análisis de la concentración de semen

3.3.3 Determinación de la motilidad espermática

Para evaluar la motilidad es importante que todos los instrumentos que tengan contacto con el semen, deben estar limpios, estériles, a 37 °C se utilizó un microscopio equipado con óptica de contraste de fase y una placa térmica (38° C) con un aumento de 100x. (Tejerina *et al.*, 2009) Se depositó una gota de semen en un portaobjetos previamente calentado en una pletina a 37oC, se colocó un cubreobjetos atemperado y se hizo una valoración inmediata. La valoración de esta motilidad es subjetiva, si bien, da una idea bastante aproximada de la calidad de la motilidad de la muestra de semen (Porta *et al.*, 2009).

Mediante el uso de microscopía óptica convencional se evaluó la motilidad espermática total (porcentaje de células móviles) y progresiva (porcentaje de células móviles con trayectoria rectilínea), a partir de siete campos visuales y un aumento de 400X (Pérez *et al.*, 2017).



Figura 13 Evaluación de la motilidad espermática, utilizando una termoplatina para mantener las laminillas temperadas a 37°C.

IV RESULTADOS

Las características seminales de los caballos colectados durante las tres épocas del año se muestran en la Tabla 1. No se observaron diferencias ($P > 0.05$) para el volumen del eyaculado, concentración y motilidad. Sin embargo, en la época de verano se pudo observar una mayor concentración espermática ($142 \times 10^6/\text{ml}$ vs $101 \times 10^6/\text{ml}$) y porcentaje de motilidad (82 vs 76) para comparado con la época invierno y primavera respectivamente.

Tabla 1 Efecto de la época del año sobre el volumen, concentración y motilidad espermática de caballos Cuartos de Milla en el norte de México.

Variables	Invierno	Primavera	Verano
Volumen (mL)	44.7±2.1 ^a	40.7±1.8 ^a	32.4±2.6 ^a
Concentración ($\times 10^6/\text{mL}$)	89.0±6.2 ^a	108.5±5.0 ^a	146.0±12.2 ^a
Motilidad (%)	76.9±0.7 ^a	76.0±1.1 ^a	81.4±1.4 ^a

^{ab}Literales con superíndice desiguales entre filas difieren a $P < 0.05$.

V. DISCUSIÓN

Las características seminales de los caballos colectados durante las tres épocas del año (Tabla 1). No se observaron diferencias ($P>0.05$) para el volumen del eyaculado, ni en la motilidad espermáticas en el verano ($P>0.05$) comparado contra el invierno y primavera. Según Miro-Arias *et al.*, (2011) para considerar una calidad aceptable para su congelación debe tener una motilidad masal mayor de 45% y una motilidad individual mayor de 60%, un porcentaje de vivos mayor del 50 % (tinción vital eosina/nigrosina) y una concentración de espermatozoides superior a 250×10^6). Los resultados determinaron que la época del año no influyo sobre el volumen seminal, concentración y motilidad espermática. Lo anterior, se consideran dentro de los parámetros normales.

De acuerdo con el mes de recolección y ubicación geográfica no se encontró diferencias estadísticas significativas en el volumen seminal, concentración espermática, motilidad espermática.

De acuerdo con lo observado con los resultados de este experimento en las características espermáticas de los eyaculados de los garañones cuarto de milla en los meses de enero a junio podemos recomendar que pueden ser recolectados para usarse en procedimientos de reproducción asistida como la inseminación en fresco y/o el procesamiento para la congelación del semen y su ulterior utilización en la inseminación artificial. Debido a los resultados encontrados en nuestro estudio sugerimos que se necesitan realizar más estudios para determinar si existe una relación entre las características de motilidad de los espermatozoides y su capacidad de fertilización (Morrell, 1997) en otras latitudes diferentes al norte de México.

V CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran que la época del año no tuvo un efecto sobre el volumen, concentración y motilidad espermática en caballos Cuarto de Milla.

VI LITERATURA CITADA

- Acuña, Juan Pablo Prado. 2011. "Comparación de dos métodos de criopreservación de semen equino, nitrógeno líquido VS -80°C, utilizando diluyentes hipometabolizantes". Universidad Austral de Chile.
- Alvarenga, Marco Antonio, Frederico Papa Ozanam, Carlos Neto Ramires, y . 2016. "Advances in Stallion S e m e n C r y o p r e s e r v a t i o n". *Veterinary Clinics of NA: Equine Practice* 32 (3): 521–30. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>.
- Andrade S., Fernando;, Igor; Frederico C., Jair; Pérez O., Liliana; Chacón J., y Sergio and Arias Serrato. 2011. "Algunos aspectos de la eficiencia reproductiva correlacionados con el semental equino". *Revista Ciencia Animal* 1 (4): 83–88. <https://ciencia.lasalle.edu.co/ca>.
- Betancur, Giovanni Restrepo, y Jaime Isaza Cadavid. 2013. "Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen" α Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Key words Resumen Palavras chave" 8 (1): 115–27.
- Blanc, Michelle Le, Cheryl Lopate, Reg R Pascoe, y . 2003. *Equine Stud Farm Medicin and Surgery*. SAUNDERS. London: El sevier science.
- Boeta, Myriam S., Alberto Balcázar, José Luis Cerbón, Juan H. Hernández Medrano, Joel Hernández Cerón, Rosa María Páramo Ramírez, et al. 2018. *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos*. 1ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510, Ciudad de México.
- Brinsko;, Steven P., Terry L. Blanchard;, Dickson D. Varner;, James Schumacher;, Charles C. Love;, Katrin Hinrichs;, y David L. Hartman. 2011. *Manual of equine reproduction*. Editado por Elsevier. 3ª edition. St. Louis, Missouri, USA. <http://www.elsevier.com/permissions>.
- Cabrera, Paulina, Raúl Sánchez, y Jennie Risopatrón. 2014. "Selección espermática en semen congelado/descongelado de equino: Evaluación de las membranas plasmática, acrosomal y potencial de membrana mitocondrial". *International Journal of Morphology* 32 (2): 725–31. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022014000200084>.
- Castro, Jefferson Abdelo Cruz, y Liliana Jaramillo Chacón. 2016. "Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión

- desde la congelación espermática". *Conexión Agropecuaria* 6 (1): 45–64.
- Cepeda, Luna Gutiérrez. 2014. "Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal". Universidad Complutense de Madrid.
- CONAGUA. 2015. "Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Cuauhtémoc (0805) Estado de Chihuahua".
- Dalmau, Consuelo Serres. 2012. "Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen". *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV)* 6 (2): 125–34.
- Duque, Juan Esteban, Benjamín A. Rojano, Giovanni Restrepo B., y C. 2017. "Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente Cryotolerance of stallion semen frozen with additives in the extender". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 28 (1): 120–29. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12944>.
- Fernando;, Andrade S., Igor; Frederico C., Jair; Pérez O., Liliana; Chacón J., y Sergio and Arias Serrato. 2011. "Algunos aspectos de la eficiencia reproductiva correlacionados con el semental equino". *Revista Ciencia Animal* 1 (4): 83–88. <https://ciencia.lasalle.edu.co/ca>.
- Gacem, Sabrina, Jaime Catalán, Iván Yáñez Ortiz, Carles Soler, y Jordi Miró. 2021. "New Sperm Morphology Analysis in Equids : Trumorph® Vs Eosin - Nigrosin Stain". *Vet Sci* 8 (79): 1–9. <https://doi.org/10.3390/vetsci8050079>.
- Galina, Carlos, y Javier Valencia. 2008. *Reproducción de los animales domésticos*. Editado por Limusa. Limusa. México.
- Giraldo;, Natalia, Juan Esteban Correa Villegas;, y Neli Vçazquez Araque. 2006. "Evaluacion del efecto de la refrigeración Sobre la calidad seminal equino Evaluation of the effect of the refrigeration on the quality of the equine semen". *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2 (2): 8–16.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Séptima Edición*. McGraw-Hill.
- INAFED. 2015. "Enciclopedia de los municipios". Mexico. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM17morelos/index.html>.
- Jaramillo, Cristina Saltos. 2007. "Efectos de la centrifugación en la motilidad espermática del semen equino refrigerado". Universidad San Francisco de Quito.

- Lozano, Benito D, Gil Huerta, Martín San Álvarez, y C. 2011. "Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado". *Sanid. mil* 67 (3): 284–90.
- Luna, Erika Irais Reyes. 2019. "Características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en baja california". Universidad Autónoma de Baja California.
- Minitube. s/f. "Fotómetro SDM 1 para análisis de la concentración de semen", 12300. <https://www.minitube.com/catalog/es/fotometro-sdm-1-calibrado-p4365/>.
- Miró, Arias M., A Vallecillo, J.M. León, y J.L. Vega Pla. 2011. "Efecto del semental sobre las características seminales del Caballo de las Retuertas". *Archivos de Zootecnia* 60 (231): 345–48. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922011000300007>.
- Morrell, J M. 1997. "CASA as an aid to selecting sperm suspensions for artificial insemination in *Callithrix jacchus*" 296: 287–96.
- Pérez, Daniel Domingo, L. Mariano Acosta, B. Giovanni Restrepo, Cesar Camacho, y O. Jair Pérez. 2017. "Freezing of equine semen under two schemes of addition of dimethylformamide Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13884>.
- Porta, Lucía E. Rangel, * Marco A. Alarcón Zapata*Carlos, *Joel Hernández Cerón *Antonio Ismael Porras Almeraya*Javier de Jesús Valencia Méndez*, *Juan Alberto Balcazar Sánchez * Myriam Boeta Acosta * Héctor Flores González* *Rosa María Páramo RamírezLucía E. Rangel Porta * Marco A. Alarcón Zapata*Carlos Galina Hidalgo*, *Joel Hernández Cerón *Antonio Ismael Porras Almeraya*Javier de Jesús Valencia Méndez*, y *Juan Alberto Balcazar Sánchez * Myriam Boeta Acosta * Héctor Flores González* *Rosa María Páramo Ramírez. 2009. *Manual de Prácticas de Reproducción Animal*. Editado por Antonio Ismael Porras Almeraya ROSA María Páramo. 1ª. México 04510, DF.
- Restrepo, Giovanni Betancur, y Sara Escobar Restrepo. 2011. "Important considerations about in vitro production of equine embryos Consideraciones importantes acerca de la producción in vitro de embriones equinos

- Considerações importantes sobre a produção in vitro de embriões eqüinos”. *Rev CES Med Vet Zootec* 6 (1): 55–63. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428105006>.
- Restrepo, Giovanni Betancur, Alexandra Úsuga Suárez, Benjamín Alberto Rojano, y . 2013. “Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen”. *Rev CES Med Zootec*. Vol. 8. Medellín, Colombia. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428109006%0ACómo>.
- Rodríguez, Luis Alonso Núñez. 2018. “Características espermáticas del eyaculado de caballos cuarto de milla ubicados en la zona costa pacífico norte y valle de Mexicali en Baja California”. Universidad Autónoma de Baja California.
- Rua, Miguel Alejandro Silva, Celia Raquel Quirino, Aylton Bartholazzi, Paula Nascimento Santoro, Mariana Da Silva Ribeiro, Wilder Hernando Ortiz Vega, y Marcus Antônio Pessanha Barreto. 2016. “Repetibilidade das características seminais, espermáticas e fertilidade de garanhões”. *Revista Brasileirade Ciencias Agrarias* 11 (2): 124–31. <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i2a5372>.
- Sánchez, Cecilia Esther Gaxiola. 2019. “Motilidad progresiva del semen equino post descongelación usando dos criopreservadores”. Universidad Autónoma de Baja California.
- Sánchez, Lourdes Sanmartín, José Perea, Isabel Blanco-Penedo, Almudena Pérez-Rico, y José Luís Vega-Pla. 2015. “Bienestar animal en equinos (*Equus caballus*): Una evaluación comparativa en reproductores del sur de España”. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 25 (6): 471–80. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95944009008>.
- Stornelli, María Alejandra, Rodolfo Luzbel De la Sota, Walter Gastón Aldabe, Miriam Beatriz Azcurra, Hernán Barrales, María Candela Bonaura, Adrián Leopoldo Bottino, et al. 2017. *Atlas de reproducción de animales de producción y compañía*. Editado por Editorial de la Universidad de La Plata. Primera ed. Buenos Aires, Argentina.
- Tejerina, Fernando ;, Morrell, Jane, A M Dalin, y Heriberto Rodriguez Martinez. 2009. “Assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a

novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm TM)". *Anim. Reprod.* 6 (January): 380–85.

- Vázquez, José Fernando Armijo, Gaspar Manuel Parra-bracamonte, Miguel Abraham Velazquez, Ana María Sifuentes-rincón, José Luis Tinoco-jaramillo, Pascuala Ambriz-morales, Williams Arellano-vera, y Victor Ricardo Moreno-medina. 2017. "Diversity and effective population size of four horse breeds from microsatellite DNA markers in South-Central Mexico". *Archives Animal Breeding* 60 (2): 137–43. <https://doi.org/10.5194/aab-60-137-2017>.
- Vélez, Angélica. 2016. "Comparación del Efecto de la Centrifugación con Coloide Equipure y del Protocolo de Refrigeración sobre la Viabilidad de la Célula Espermática en Caballo Criollo Colombiano utilizando dos medios diluyentes (Kenney, Botuspecial)". Universidad de La Salle, Bogotá. <https://ciencia.lasalle.edu.co/>.
- Vera, Constanza Javiera Elgueta. 2018. "Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos". Universidad de las Américas.