

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE  
EPIDÍDIMO EQUINO”**

**BALDOMERO OLGUÍN RAMÍREZ**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**SEPTIEMBRE DE 2013.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

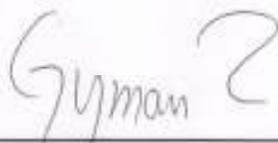
**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**"TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES  
DE EPIDÍDIMO EQUINO"**

**APROBADO POR EL COMITÉ**

**PRESIDENTE DEL JURADO**



**MVZ. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE  
CIENCIA ANIMAL**



**MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO**



**Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal**

**UNIVERSOD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

"TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE  
EPIDÍDIMO EQUINO"

MONOGRAFÍA POR:

**BALDOMERO OLGUÍN RAMÍREZ**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**MVZ. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS**  
PRESIDENTE

**MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ**  
VOCAL

**MVZ. CARLOS RAMÍREZ FERNÁNDEZ**  
VOCAL

**MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO**  
VOCAL SUPLENTE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE  
EPIDÍDIMO EQUINO”**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**BALDOMERO OLGUÍN RAMÍREZ**

**ASESOR:**

**MVZ. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS**

**COLABORADOR:**

**DRA. MYRIAM BOETA ACOSTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**SEPTIEMBRE DE 2013.**

# Dedicatoria

*A mis hermanas y hermano que están presentes cada día.*

*A mi madre y padre, a Ustedes les debo todo.*

*A mi familia.*

# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría hacer mención a la labor desarrollada por mis asesores de monografía y otros médicos que forman parte de la UNAM y de la UAAAN, ya que sin ellos ésta no hubiera sido posible. En especial a la Dra. Myriam Boeta por haberme iniciado en este apasionado mundo de la reproducción equina, gracias también por la paciencia en la corrección de la monografía. Sin duda, nunca sabré como agradecerle todo lo que ha hecho por mí. ¡Gracias!

A continuación, mis más sinceros agradecimientos a la plantilla de CEIRE, configurada por un sinfín de gente muy especial, que son responsables de este buen ambiente de trabajo, cuyos ánimos y ayuda siempre que la he necesitado me la han otorgado.

Dentro de CEIRE al grupo de reproducción equina, a todos los Médicos que forman parte o han formado parte de este a lo largo del año (Betsabe, Sandra, Abraham, Lizeth, Maricruz, María Fernanda, Alain, Ely, Jaqueline, Europa, Mauricio, Salvador) y con los cuales he pasado ratos muy divertidos (los que quiero que perduren en mi memoria). El grupo es lo que es gracias al granito de arena aportado por todos y cada uno de ellos. El haber trabajado durante todo este tiempo a nuestro lado ha sido todo un orgullo y una satisfacción.

También a mis amigos de la universidad Lucero, Dora, Mari Delia, Yesica, Juan, Silvano, Adrián, Alfredo, Ismael y Omar, con los que he atravesado el duro y largo camino de la carrera, camino que llega hasta hoy. Gracias por estar ahí siempre que los he necesitado y por haberme desprendido una sonrisa hasta en los momentos más duros.

Gracias, también, a la gente tan maravillosa que he encontrado en mi estancia en Torreón y a los cuales no olvidaré, a Cristina, Fabiola, Fabricio y Eliu que me han integrado como de su familia.

Gracias a mi familia, a mis tías y a ustedes dos Francisca y Enedina (aunque no hayan podido ver mi culminación); a mis primos y primas en especial a Ana, por haberme apoyado a lo largo de esta dura etapa del último año y por todo nuestro cariños. Los quiero.

A mami Dela, que se encuentra mejor que nunca, ha visto el esfuerzo que he desempeñado y se sienta tan orgullosa de su nieto como siempre lo ha hecho. Hoy en día ve el fruto de su esfuerzo que ha sido participe a lo largo de toda su vida. Te quiero.

A mis hermanas, Azucena, Judith y Leticia, ¡qué puedo decir de ellas! Han demostrado ser las mejores hijas, hermanas, nieta. Han sido capaces de superar todas las adversidades, haciéndose más fuerte. Las quiero mucho. Gracias a ti hermano Isai Donato, por estar conmigo desde la infancia y hoy me veo orgulloso de tenerte y verte realizando tus metas para ser un buen y mejor doctor. A mi sobrinos Octavio y Regina, los cuales tendré presente que serán unos buenos hijos ante mis hermanas.

A ti mamá, a la que le dedico especialmente la monografía. Todo lo que soy lo debo a papá y a ti. Gracias por tus consejos, paciencia, entrega, lucha, fuerza de voluntad y, sobre todo, el amor que nos has demostrado durante todo estos años. Gracias por ser tan buena madre y por luchar por lo que te mereces. No tengo palabras para expresar todo lo que siento por ti. Te quiero demasiado.

Por último, a mi padre, el cual le dedico también en especial este trabajo. Gracias por ser como has sido y por habernos querido tanto, por haber demostrado esa fuerza, capacidad de sacrificio y lucha.

Quisiera expresar de nuevo mis agradecimientos a todas las personas que he reflejado aquí y a todas las que haya podido olvidar sin mala intención. Habrán sido muy especiales a lo largo de este camino y todos, cada uno ustedes han hecho posible el desarrollo de mi carrera.

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>5</b>
<b>Anatomía, fisiología del testículo y epidídimo .....</b>	<b>5</b>
1.1 Escroto.....	6
1.1.1 Testículos.....	8
1.1.1.1 Células somáticas.....	13
1.1.1.1.1 Células de Sertoli.....	13
1.1.1.1.2 Células de Leydig .....	14
1.1.2 Epidídimo .....	15
1.1.2.1 Cabeza .....	15
1.1.2.2 Cuerpo .....	16
1.1.2.3 Cola .....	16
1.1.2.3.1 Funciones del epidídimo .....	17
1.1.2.3.2 Tiempo de transito de espermatozoides en el epidídimo.....	17
1.1.2.3.3 Influencia hormonal.....	18
1.1.2.3.4 Andrógenos.....	18
1.1.2.3.5 Estrógenos.....	18
1.1.2.3.6 Receptores de estrógeno y andrógeno en el epidídimo .....	19
1.1.2.3.7 Secreciones del epidídimo.....	19
1.1.2.3.7.1 Lactoferrina y transferrina en el epidídimo equino.....	20
1.1.3 Conducto deferente .....	20
1.1.4 Termorregulación de la temperatura testicular .....	21
1.1.5 Descenso testicular.....	24
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>27</b>
<b>Espermatogénesis.....</b>	<b>27</b>
2.1 Fases de desarrollo .....	27
2.1.1 Espermatocitogénesis .....	30
2.1.1.1 Meiosis.....	37
2.1.2 Espermiogénesis.....	38
2.1.2.1 Fase Golgi.....	39
2.1.2.2 Fase de revestimiento .....	41
2.1.2.3 Fase de alargamiento.....	42
2.1.2.4 Fase de maduración.....	42
2.2 Cinética de la espermatogénesis .....	44
2.2.1 Etapas del ciclo de la espermatogénesis.....	44
2.2.2 Duración del ciclo y de la espermatogénesis .....	46
2.2.3 Ola espermatogénica.....	46
2.3 Establecimiento de la espermatogénesis .....	47
2.4 El espermatozoide.....	49
2.5 Tiempo entre la espermatogénesis y la aparición de los espermatozoides en el eyaculado.....	53
2.6 Interacción hormonal .....	54
2.7 Transporte de los espermatozoides .....	55

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>56</b>
<b>Evaluación espermática.....</b>	<b>56</b>
3.1 Aspecto microscópico.....	57
3.1.1 Concentración.....	57
3.1.1.1 Hemocitómetro.....	57
3.1.1.1.1 Protocolo para la realizar conteo mediante hemocitómetro .....	58
3.1.2 Motilidad.....	60
3.1.2.1 Evaluación visual .....	61
3.1.3 Morfología .....	62
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>66</b>
<b>Obtención de espermatozoides de epidídimo .....</b>	<b>66</b>
4.1 Viabilidad de los espermatozoides de epidídimo .....	66
4.2 Técnicas.....	67
4.2.1 Flotación .....	67
4.2.2 Lavado retrogrado .....	68
4.2.3 Lavado retrogrado modificado.....	69
4.2.3.1 Procedimientos de la técnica.....	70
4.2.3.1.1 Obtención de órganos.....	70
4.2.3.1.2 Embalaje para el transporte.....	72
4.2.3.1.3 Disección de la cola del epidídimo .....	73
4.2.3.1.4 Lavado retrogrado .....	75
4.2.3.1.4.1 Procedimientos previos al lavado epididimal.....	75
4.2.3.1.4.2 Procedimiento.....	76
4.2.3.1.5 Incubación.....	77
4.2.3.1.6 Evaluación espermática .....	78
4.2.3.1.6.1 Motilidad.....	78
4.2.3.1.6.2 Morfología y Mortalidad.....	78
4.2.3.1.6.3 Concentración.....	79
4.2.3.1.6.4 Espermatozoides viables.....	79
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>82</b>

## RESUMEN

---

Toda razón tiene un origen y en esta presentación se tomarán en cuenta una revisión literaria sobre biotecnología reproductiva, que nos permitirá conocer la obtención de material genético de eventos espontáneos que han afectado la vida del semental, orquiectomía y la eutanasia humanitaria.

Se debe tener conocimiento de la anatomía-fisiología del testículo y epidídimo, desarrollo de la espermatogénesis, evaluación de espermatozoides, técnicas de obtención de espermatozoides de epidídimo y los procedimientos de los que se haya tenido mejor éxito.

El objetivo de esta revisión es brindar la información en la selección de la mejor técnica de recuperación, como última opción cuando sucedan eventos espontáneos que intervenga con la vida del semental y en un intento para preservar su material genético.

**1. PALABRAS CLAVE: Espermatozoides, Epidídimo, Espermatogénesis, Evaluación espermática, Lavado retrogrado.**

## INTRODUCCIÓN

---

Eventos espontáneos, como cólico, fracturas, accidentes durante la actividad deportiva que pongan en peligro la vida de un garañón o que por razones humanitarias lleven a la eutanasia, o simplemente la necesidad de someter a un potro a orquiectomía por su difícil manejo, implican pérdidas genéticas y económicas. Estos motivos llevan a los propietarios de sementales valiosos a solicitar la colección y procesamiento de espermatozoides de epidídimo (Monteiro, 2011).

La obtención de los espermatozoides de epidídimo es un método, que a partir de ambos órganos del semental al que se le práctico eutanasia u orquiectomia, son extraídos y transportados temperaturas 4°C a un tiempo no mayor a 96 horas para conservarlos (James *et al.*, 2002).

Una vez en el laboratorio se obtienen los espermatozoides mediante una técnica de lavado retrogrado modificada (Granemann, 2006) y posteriormente son evaluados para determinar su viabilidad (Garde *et al.*, 1994; Bruemmer *et al.*, 2002) y podrán ser utilizados en forma directa o criopresevados para una futura inseminación (Monteiro, 2011).

## CAPITULO I

---

### **Anatomía, fisiología del testículo y epidídimo**

La estructura física de cada semental equino son determinantes para la reproducción no obstante están constantemente en riesgo de sufrir alguna lesión que les impida continuar con su vida o su reproducción. Los testículos normales de un equino son estructuralmente ovalados de un tamaño semejante de uno al otro, se posicionan horizontalmente, localizándose dentro de las bolsas escrotales con la cola del epidídimo dirigida caudalmente (Sisson, 1975).

La orientación testicular normal se determina mediante la palpación del ligamento caudal y cola del epidídimo. El ligamento es una estructura que es remanente del gubernaculo, el cual se cree que juega un papel en la orientación de los testículos en el escroto. A la palpación es diferenciado como un nódulo fibroso de 5 a 19 mm, que va desde estructura adyacente hasta el polo caudal del testículo (Varner *et al.*, 1991b).

Como tal la gónada testicular se encuentra encapsulada por la túnica albugínea dentro del escroto, estructuralmente la túnica se encuentra constituida por tejido de colágeno y músculo liso, estando fusionada en el exterior con la capa visceral de la túnica vaginal (Varner *et al.*, 1991b).

Existen variaciones normales que pueden ser observadas como la posición de los testículos siendo uno relativamente anterior o ventral al otro, la piel debe de encontrar libre de evidencias traumáticas como son: cicatrices o lesiones. A la palpación del escroto de un equino normal, debe mostrar una cubierta fina y flexible, debiendo deslizar libremente de los testículos y epidídimos que se localizan en su interior (Setchell *et al.*, 1994). Véase figura 1.

La orientación abaxial de la red de testis es considerada normal en el equino en comparación de las demás especies, por lo cual esta estructura es menos prominente y difícil de identificar ecográficamente (Sisson, 1975).

Desviación normales de un testículo como es la firmeza: blando o mas firme, puede asociarse con enfermedades degenerativas como son neoplasias o traumatismos del testículo (Varner, 1991b).



**Figura. 1** a) Se muestra al escroto del semental ligeramente colgante con los testículos sostenidos en posición horizontal, b) testículo y epidídimo: 1. Fascia espermática externa, 2. Músculo cremáster, 3. Cola del epidídimo, palpable, 4. Borde libre del testículo (pc). Porción caudal del testículo (pcr). Porción craneal del testículo. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción. FMVZ-UNAM. 2013).

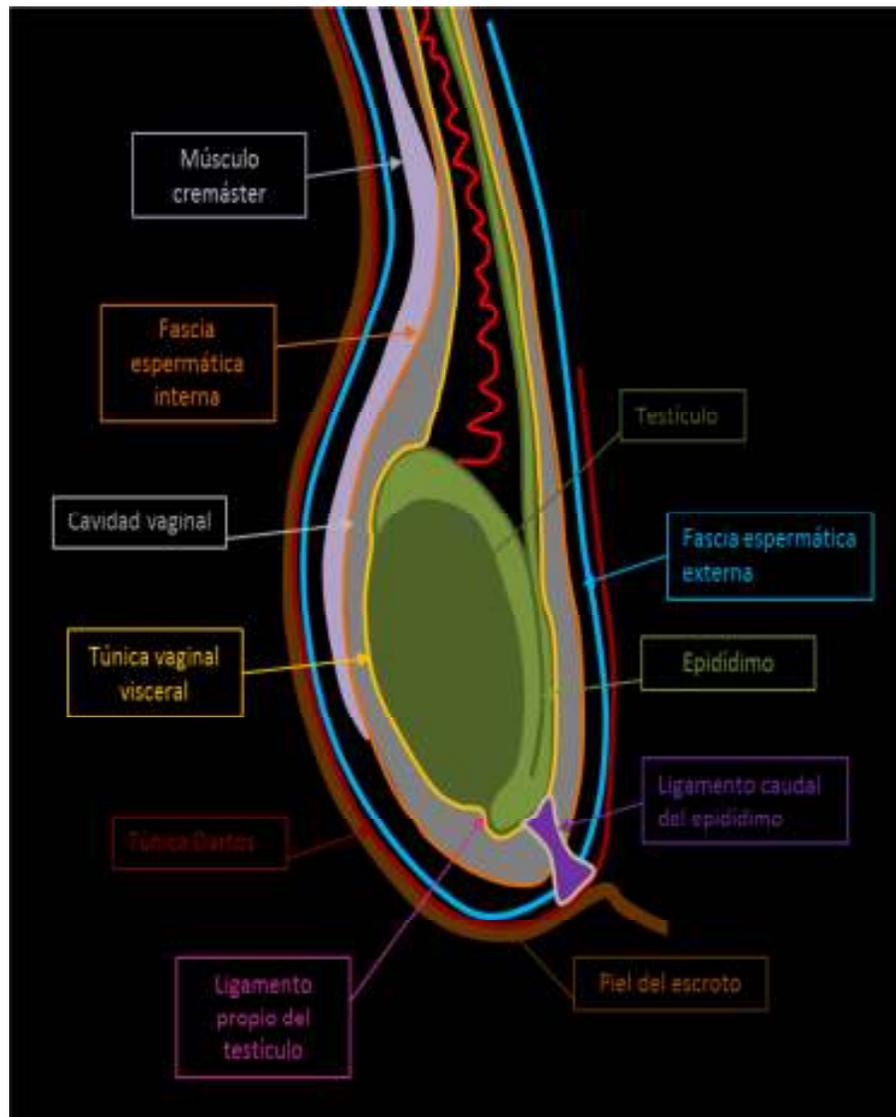
## 1.1 Escroto

Esta estructura consiste en un recubrimiento de piel cuya función es mantener la temperatura del testículo y esta integrado por cuatro capas diferenciadas:

- 1.- piel
- 2.- tunica de dartos
- 3.- fascia escrotal
- 4.- túnica vaginal parietal

El escroto se localiza en la región inguinal y a comparación de los rumiantes forma dos bolsas distintas, las cuales contienen en su interior a los testículos, epidídimos y cordones espermáticos para protegerlos del medio externo (Cêrveny *et al.*, 2005).

La piel del escroto es delgada carece de pelo contiene glándulas sebáceas y sudoríparas que participan en la termorregulación (Varner, 1991b). Véase la figura 2.



**Figura. 2** Esquema del testículo derecho del garañón y sus envolturas. (Tomada de Cêrveny *et al.*, 2005).

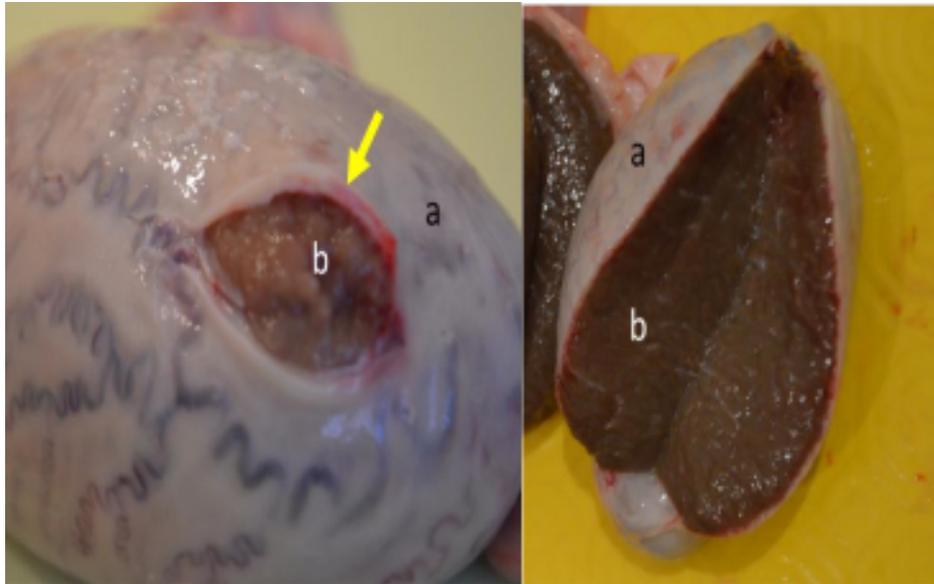
La túnica dartos que está compuesto de tejido muscular y fibroelástico que recubre ambas bolsas escrotales y extendiendo hasta el septo medio, llamado el rafe del escroto y se encuentra adherida a la piel del mismo. El grado de contracción o relajación de esta capa permite alterar el tamaño, forma y la posición del escroto en relación con la pared del cuerpo ayudando y contribuyendo con ello la termorregulación testicular (Cêrveny *et al.*, 2005).

Le continua la fascia escrotal constituida por un tejido conectivo laxo, entre el dartos y la túnica vaginal y su función es permitir el movimiento libremente en el escroto en conjunto con la túnica parietal. (Johnson y Tatum, 1989).

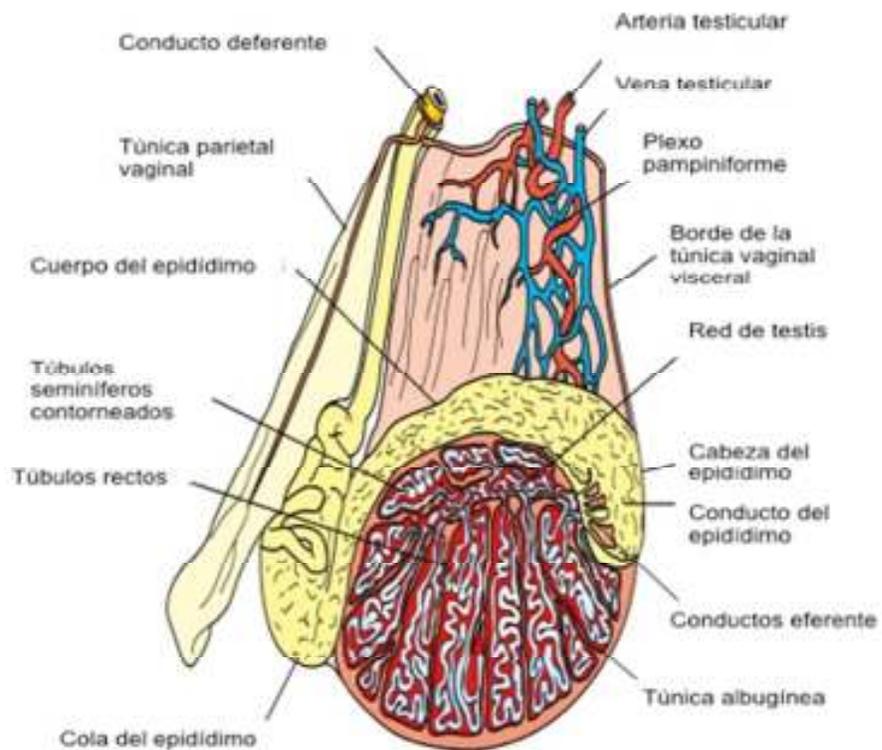
La túnica vaginal parietal es la capa más interna del escroto siendo una evaginación del peritoneo parietal a través de los anillos inguinales la cual se integra en el descenso testicular correlacionado con el escroto y está estrechamente adosados a la túnica vaginal visceral la cual forma una capa externa de los testículos, la cavidad vaginal es el espacio entre el parietal y visceral. Esta capas peritoneal, esta formado por dos laminas: la parietal que se considera parte del escroto y la vaginal que se adhiere al testículo y entre ellas existe una pequeña cantidad de fluido que le permite protección movimiento libre del órgano (Setchell *et al.*, 1994).

### **1.1.1 Testículos**

El testículo es la gónada masculina y la producción de espermatozoides ademas de la hormona esteroideal predominante en el macho (la testosterona). Los testículos son ovoides ligeramente comprimidos de lado a lado con su eje largo casi horizontal largo (Johnson y Neaves, 1981). Véase figura 4.



**Figura. 3** Testículo. (a) Túnica albugínea. (b) Parénquima testicular. La flecha amarilla señalando el grosor de la túnica albugínea (1-2 mm). (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

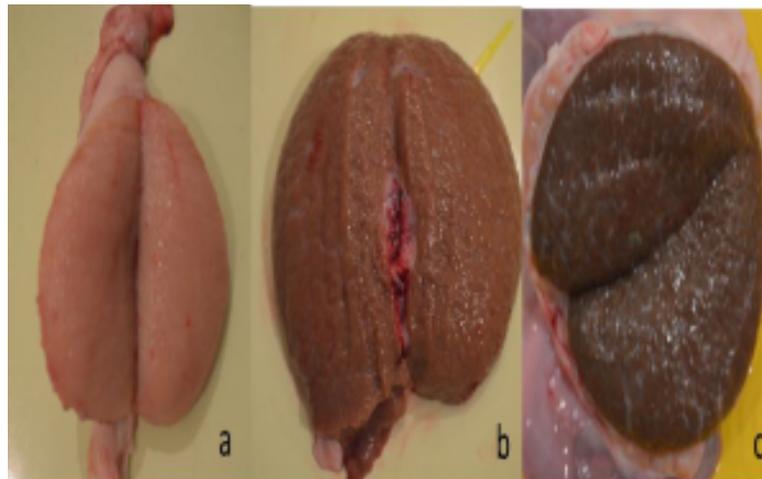


**Figura. 4** Corte transversal del testículo, (Tomada de Pickett., *et al*, 1989).

Las gónadas se encuentran rodeadas por separado por la túnica albugínea siendo de aspecto de laminas de tejido fibroso que invaden lo invaden y lo formándolo en lóbulos. Cada lóbulo esta integrado por túbulos seminíferos y con espacios entre ellos. En cada túbulo se llevan a cabo las funciones: gametogénesis y en el espacio inter tubular se encuentran las células de Leydig cuya función es endocrina (Johnson y Nguyen, 1986) Véase figuras 3 y 4.

Continuando con el parénquima que es parte de los testículos, siendo ligeramente pigmentados en un semental pos púber, moderadamente pigmentado en la edad de 4 a 5 años del semental y la pigmentación oscura aumenta cuando el semental va aumentando su edad (Johnson y Neaves, 1981). Véase figuras 3 y 5.

Debido a que las regiones oscuras son características por un intersticio pigmentado, esta pigmentación va ocurriendo por procesos degenerativos de tejido no funcional. Esta pigmentación también ocurre cuando hay una mayor concentración de células se Sertoli y gonocitos. (Johnson *et al.*, 1990b). Que se muestra en la figura 5.



**Figura. 5** Cambios de coloración del parénquima testicular. a). Caballo 2.5 años, b). Caballo 9 años, c). Caballo 16 años. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

El parénquima testicular está constituido por los túbulos seminíferos y el tejido intersticial (túnica albugínea); estos túbulos están revestidos por un epitelio germinal e intercaladas con células germinales (Fawcett *et al.*, 1975) y células de Sertoli (Pickett *et al.*, 1989; Johnson y Neaves, 1981; Kretser *et al.*, 1988). Véase figuras 4 y 6.

La forma de un túbulo seminífero es arqueada y está compuesto por tres zonas (Pickett *et al.*, 1989):

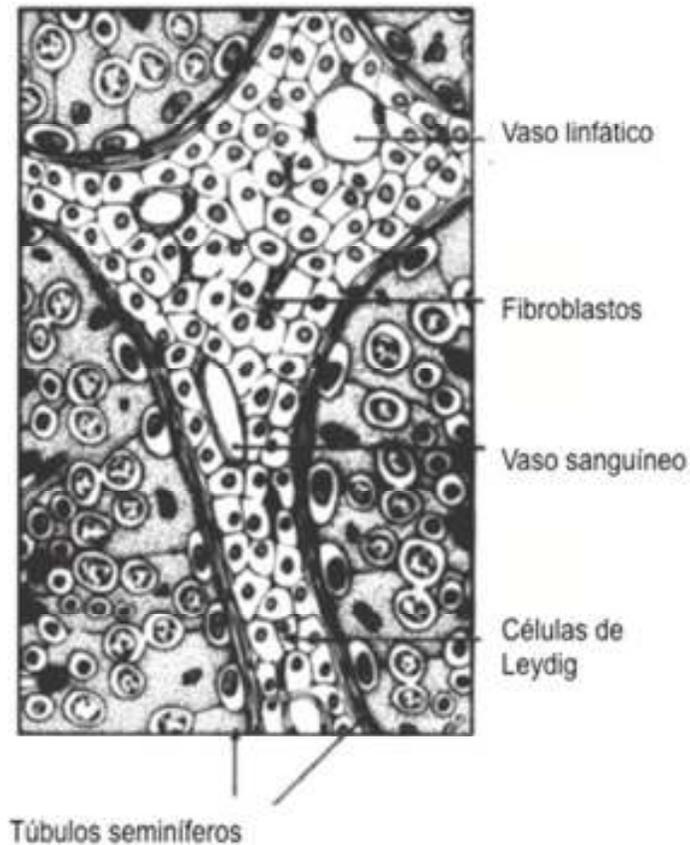
- 1) La porción principal del túbulo seminífero que es recta,
- 2) contorneada que está altamente enrollada
- 3) y la parte final converge para formar la red de testis (Banks, 1986).

Ambos extremos de la porción contorneada de un túbulo seminífero son continuas como zonas de transición que conducen a las partes rectas de los túbulos seminíferos los cuales son el primer componente del conducto, a través del cual los espermatozoides pasan del epitelio seminífero al epidídimo, los túbulos rectos convergen en la porción de los dos tercios craneales del testículo, una zona denominada como la red de testis (Hemeida *et al.*, 1978). Véase figura 4.

Eventualmente cada unión de los túbulos seminíferos se fusiona con uno de los 13-15 conductos eferentes del testículo los cuales conducen al conducto del epidídimo (Hemeida *et al.*, 1978).

Cada túbulo está constituido por una se delimitan por una lámina propia están constituidos por fibroblastos y células lisas llamadas mioideas, estas causan contracciones rítmicas que son consideradas para mover los espermatozoides y los líquidos de los túbulos seminíferos, en su interior se encuentran las células germinales que son característicamente más notables en estas estructuras. Internamente están estructurados principalmente por las células germinales y entre ellas se encuentran una células especializadas denominadas de Sertoli las cuales tienen una función fundamental en el sistema inmunitario, coordinación en la diferenciación y aislamiento celular germinal; Estas células constituyen la

barrera hemato testicular debido a la unión adyacente entre ellas y esto hace que se formen dos compartimentos funcionales dentro del túbulo : periférico o basal y el interno o adluminal (Pickett *et al.*, 1989). Véase figura 6.



**Figura. 6** Corte histológico de testículo de garrañón que muestra la relación entre los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, células de Leydig del tejido intersticial y en los túbulos seminíferos (Tomada de Pickett *et al.*, 1989).

En el primer compartimento se localizan las espermatogonias que son derivadas de la proliferación del epitelio germinal (Hochereau-de Reviere *et al.*, 1990). En el segundo compartimento considerado como parte de la barrera se encuentran las espermatidas y espermatozoides las cuales son los futuros espermatozoides con la capacidad de fertilizar (Johnson y Thompson, 1983; Berndtson *et al.*, 1983; Johnson y Thompson 1986; Berndtson *et al.*, 1987). Véase figura 4.

Funcionalmente la barrera hemato-testicular aísla a las células germinales diferenciadas del sistema inmune del gafañón (Hochereau- de Reviers *et al.*, 1990), debido a que el desarrollo del sistema inmune se encuentra expuesto a los espermatoцитos diferenciados o espermátidas. Ya que sino estuviera este barrera, el sistema inmune consideraría a toda célula como extraña que podría ser destruida (Kretser *et al.*, 1988).

#### 1.1.1.1 **Células somáticas**

Estas son las células propias del testículo y se reconocen las células de Sertoli y las células de Leydig (Setchell *et al.*, 1988).

##### 1.1.1.1.1 Células de Sertoli

Las células de Sertoli localizadas en los túbulos genera proteínas necesarias en el transporte vitamina A, minerales como el hierro y cobre, necesario para el desarrollo y producción de las células germinales y regulación en formación de espermatozoides (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1987).

Cualquier alteración de las células que ocurra antes de la pubertad pueden alterar la cantidad y funcionalidad de la espermatogénesis (Hochereau-de Reviers *et al.*, 1987).

A pesar de que convencionalmente se acepta que las células de Sertoli no se dividen después de la pubertad (Setchell, *et al.*, 1988; Kretser *et al.*, 1988), resultados de investigaciones demostraron que las células de Sertoli en el semental proliferan cuando la temporada reproductiva empieza (Johnson y Thompson, 1983; Johnson, 1986; Johnson y Nguyen, 1987; Johnson y Tatum, 1988) y es determinante en el número de espermatozoides que se puedan producir (Berndtson *et al.*, 1987).

La correlación con el número de células de Sertoli con gramo de parénquima es determinante para una posible concentración de las células germinales que estén presentes (Johnson y Thompson, 1983) Véase figura 5.

#### 1.1.1.1.2 Células de Leydig

Estas se encuentran en el tejido intersticial formadas por hormonas esteroidales y siendo la principal la testosterona (Johnson y Neaves, 1981).

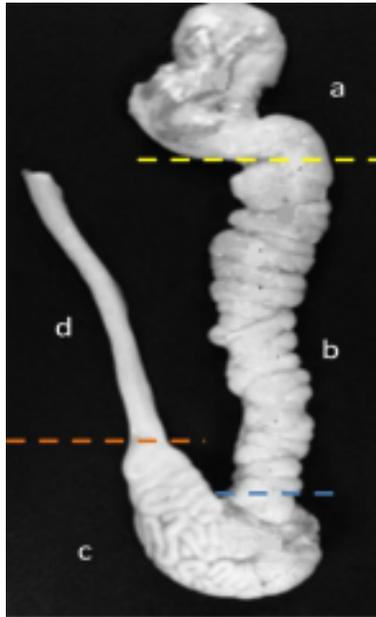
Cuando los sementales son adultos, las células de Leydig jóvenes serán remplazadas gradualmente por maduras, las cuales contendrán lípidos pigmentados que estén conectados por numerosas inter digitaciones. Además la producción de testosterona será mayor proporcionalmente en comparaciones de los sementales de corta edad (Almahbobi *et al.*, 1988).

La correlación con el número de células de Sertoli con gramo de parénquima es determinante para una posible determinación de la concentración de las células germinales que estén presentes (Johnson y Thompson, 1983) Véase figura 5.

Cuando avanza la edad del semental, puede ser parcialmente responsable en la disminución de la producción diaria de espermatozoides, aunque el porcentaje de los túbulos seminíferos ocupados en los testículos no cambia con la edad pero su longitud si aumenta un tercio y el volumen total de células de Leydig por gramo de parénquima testicular aumenta más de tres veces con la edad. Se ha reportado que la composición porcentual de los testículos en base a volumen y la proporción de las células de Leydig de los túbulos seminíferos va cambiando con la edad, aunque algunos de los cambios que se presentan son por consecuencia al crecimiento de los testículos (Johnson y Neaves, 1981; Johnson y Thompson, 1983).

### 1.1.2 Epidídimo

El epidídimo en el equino se localiza sobre la superficie del testículo, cada epidídimo es un conducto contorneado, pero no ramificado de aproximadamente 70 metros de largo (Varner *et al.*, 1991<sup>a</sup>), dividiéndose anatómicamente en tres secciones: cabeza, cuerpo y cola (Amann y Schanbacher, 1983). Véase figura 7.



**Figura. 7** Epidídimo y sus secciones. a). cabeza, b). cuerpo, c). cola, d). Conducto deferente. (Tomado de Foster y Ladds, 2007).

#### 1.1.2.1 Cabeza

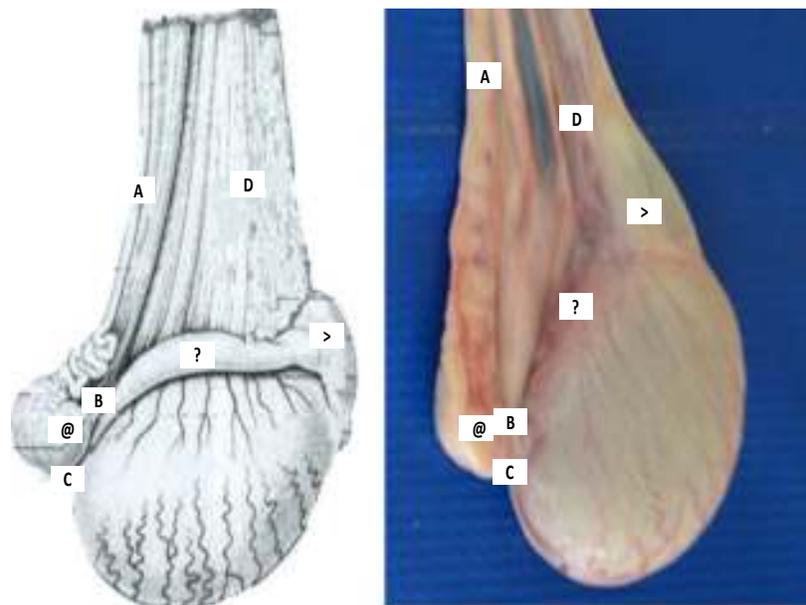
La cabeza es plana teniendo forma de J, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa unos 2.5 a 3 cm de la superficie dorso medial del testículo y está estrechamente unido al mismo, se inserta en los extremos distales de 13 a 15 conductos eferentes altamente enrollados (Hemeida *et al.*, 1978). Se estima la longitud sea de 45 metros, formando un patrón de pliegues que continua en el cuerpo y cola del epidídimo (Foster y Ladds, 2007). Véase figura 8.

### 1.1.2.2 **Cuerpo**

Es una estructura más firme, palpable a lo largo de la cara dorso-lateral de cada testículo y está estrechamente unido al mismo, esta sección es el sitio en que los espermatozoides están en un período de tiempo de 7 días en el epidídimo (Aime *et al.*, 2011).

### 1.1.2.3 **Cola**

Es fácilmente palpable como una protuberancia esférica, la cual es distinta en comparación con el polo caudal del testículo, la ubicación de la cola se puede utilizar para ayudar en la determinación de la orientación del cordón espermático, esta sección se encuentra anclada por el ligamento propio y caudal del testículo (Aime *et al.*, 2011).



**Figura. 8** Cabeza del epidídimo, 2. Cuerpo del epidídimo, 3. Cola del epidídimo, 4. Conducto deferente, 5. Ligamento caudal del epidídimo, 6. Ligamento propio del testículo, 7. Mesorquio. Fuente: esquema, (Cêrveny *et al.*, 2005), imagen (Proporcionada por el Depto. de Reproducción. FMVZ-UNAM, 2013).

#### 1.1.2.3.1 Funciones del epidídimo

Por la parte funcional el epidídimo puede subdividirse en muchas regiones que poseen sus propios tipos de células epiteliales diferenciadas (Thompson y Evans, 1992). Existen cuatro funciones básicas:

1. Almacenamiento de espermatozoides (Samper, 1995).
2. Reabsorción de espermatozoides que están en un tiempo prolongado de lo normal y así aumentando la capacidad de almacenamiento de nuevos gametos (Thompson y Evans, 1992).
3. Sitio de maduración de espermatozoides, que incluye la motilidad y capacidad de fertilización, dada por secreciones del epitelio del epidídimo. Los cambios que ocurren durante este proceso incluyen;: condensación de cromatina, redistribución de las proteínas de membrana y alteración en la actividad de la bomba de iones. (Hafez y Hafez, 2000; Chenier, 2007; Amman, 2011).
4. Y es determinante en la composición de fluido circundante de los espermatozoides de epidídimo (Hafez, 2000).

Este fenómeno implica que existe una condensación por reabsorción de fluidos, se lleva a cabo en los conductos eferentes y cabeza (Hess, 2003), el proceso de maduración ocurre en el extremo proximal del cuerpo y la cola, en esta última parte es el órgano de almacenamiento (Sostaric *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.3.2 Tiempo de tránsito de espermatozoides en el epidídimo

Este fenómeno de tránsito y maduración de los gametos por su paso a través del epidídimo es de una duración de 9 a 11 días en todas las especies (Aime *et al.*, 2011). En el caso de los equinos se reporta una duración de 5 y 14 días (Franca *et al.*, 2005).

A este movimiento a través del epidídimo se le atribuye a la acción de las prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), la que induce contracciones peristálticas continuas de los músculos lisos de la pared de la cabeza y el cuerpo del epidídimo (Cosentino, 1986).

Sin embargo la cola del epidídimo se encuentra bajo la influencia de un combinado hormonal, vasopresina, oxitocina, y ambas prostaglandinas (PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub>) bajo su acción los espermatozoides son llevados a los conductos eferentes bajo el proceso de eyaculación. En este sitio la PGE<sub>2</sub> inhibe la contractilidad del musculo liso de la cola del epidídimo y esta es contrarrestada por acción de la oxitocina, vasopresina y la estimulación simpática (Cosentino, 1986).

#### 1.1.2.3.3 Influencia hormonal

#### 1.1.2.3.4 Andrógenos

El epidídimo durante mucho tiempo ha sido conocido por ser un tejido dependiente de andrógenos en otras especies (Cooper, 1995; Robaire y Viger, 1995). Bajo la regulación de andrógenos [testosterona y/o dihidrotestosterona (DHT)], las células de las proteínas del epitelio del epidídimo producen, glicoproteínas, glicolípidos, y fosfolípidos, los cuales son todos los componentes de fluido epididimal necesario para la maduración, capacitación y la supervivencia de los espermatozoides (Bilinska *et al.*, 2006).

#### 1.1.2.3.5 Estrógenos

Estudios recientes han revelado que el estradiol tiene un papel mucho más importante en la reproducción masculina que se creía, sobre todo en el nivel del epidídimo. Ha quedado claramente demostrado que el estrógeno regula la reabsorción de fluido luminal en los conductos eferentes de los ratones y sin esta funciones, estos animales serian infértiles (Hess y Carnes, 2004).

#### 1.1.2.3.6 Receptores de estrógeno y andrógeno en el epidídimo

Las células del epidídimo poseen receptores AR, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , para andrógenos y estrógenos respectivamente los cuales han sido identificados en varias especies incluyendo al equino (Zhou *et al.*, 2002; Hejmej *et al.*, 2005; Bilinska *et al.*, 2005; Parlevliet *et al.*, 2006).

Los estrógenos y andrógenos transitan en el fluido luminal y sus receptores (ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR) se encuentran en el epitelio del epidídimo. (Parlevliet *et al.*, 2006). Los receptores ER $\alpha$  y el segmento de tejido dependiente se forman cuando el equino alcanza una madures sexual, mientras que RA y ER $\beta$  están presentes en equinos de todas las edades (Zhou *et al.*, 2002; Hejmej *et al.*, 2005; Bilinska *et al.*, 2005; Parlevliet *et al.*, 2006).

Estudios realizados no encontraron receptores de ER $\alpha$  presentes en el epitelio de la cola de los animales pre púberes ni en el cuerpo del epidídimo de los animales después de la pubertad. Lo receptores ER $\beta$  si se encontraron presentes en el epitelio de todas las tres regiones del epidídimo a lo largo del desarrollo y en la edad adulta del semental (Nie *et al.*, 2002; Yamashita, 2004).

El receptor ARS también se encontraron presentes en el epitelio del epidídimo de los tres segmentos de todas las edades. Recientemente se ha sugerido que la función del epidídimo está regulada principalmente por esteroides testiculares, por que se a determinado que los propios espermatozoides pueden influir en la función del epidídimo (Reyes-Moreno *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.3.7 Secreciones del epidídimo

Se ha observado utilizando electroforesis bidimensional la producción de las proteínas en el epitelio del epidídimo y la secreción en el lumen (Foucheourt *et al.*, 2000). Usando este enfoque proteínico, se encontraron 201 proteínas en el lumen y 117 que son secretadas por el epitelio del epidídimo. Las principales proteínas que son secretadas principalmente por el epitelio son: la lactoferrina y

la clusterina junto con otros componentes tales como procathepsin D, beta-N-acetil-hexosaminidasa, y prostaglandinas D2 SYN-Thase (PDGS). Las principales proteínas y compuestos que se encuentran en el fluido luminal fueron albúmina, lactoferrina, PGDS, GPX, HE/CTP, Y hexosaminidasa (Foucheourt *et al.*, 2000).

#### 1.1.2.3.7.1 Lactoferrina y transferrina en el epidídimo equino

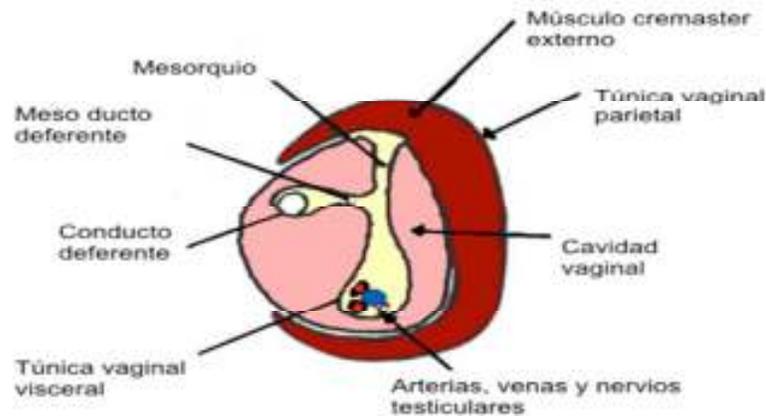
Dos proteínas que recientemente han sido investigadas en el epidídimo equino son: lactoferrina (Pearl y Roser, 2006) y transferrina (Parlevliet *et al.*, 2004). Datos preliminares indican que la lactoferrina es una proteína de defensa y antioxidante, se localizó en la membrana de los espermatozoides en la región intermedia y la cola (Parlevliet *et al.*, 2004).

Estudios realizados, demostraron que la transferrina es una proteína que se une con el hierro, el cual se encuentra presente en todas las regiones del epidídimo de todas las edades. Sin embargo se encuentra mas concentrada en la cola del epidídimo a comparación de otras regiones del mismo y el testículo. También se demostró que la cantidad de transferrina en una región en particular era dependiente de la edad (Parlevliet *et al.*, 2004; Parlevliet *et al.*, 2008).

#### 1.1.3 Conducto deferente

El conducto deferente, es una vía de salida de los espermatozoides, el cual se encuentra unido a la cola del epidídimo, localizándolo a lo largo de la cara medial del testículo y asciende a través del cordón espermático por el anillo vaginal de la pelvis, está constituido por una pared gruesa de musculo liso. La porción proximal del conducto se puede palpar fácilmente a través de la piel del escroto (Varner *et al.*, 1991<sup>a</sup>).

Se a determinado que el cordón espermático se extiende desde el abdomen por el anillo inguinal, para su inserción en el testículo, el cual ayuda también a suspender al escroto. Esta estructura contribuye en dirigir al conducto deferente, nervios y vasos sanguíneos asociados con el testículo. El músculo cremaster externo se encuentra visible en la cara lateral del cordón espermático, aunque este no pertenezca ala misma estructura (Berndtson et al., 1987). Véase figura 9.



**Figura. 9** Sección transversal del cordón espermático derecho y el músculo cremáster por encima del plexo pampiniforme, (Tomada de Pickett *et al.*, 1989).

#### **1.1.4 Termorregulación de la temperatura testicular**

Como se menciona anteriormente el escroto sirve para cubrir y proteger los testículos, pero su función principal es la regulación de la temperatura en el testículo y epidídimo, esto se consigue mediante dos mecanismos básicos: transferencia de calor vascular y los cambios de posición respecto a la pared abdominal (Roberts, 1986; Friedman *et al.*, 1991).

La primera función se caracteriza por ser un mecanismo de refrigeración, mientras la segunda facilita o minimiza la pérdida de calor. Estos mecanismos permiten a los testículos del equino a que se encuentren a una temperatura de 33°C, siendo una temperatura inferior a la corporal, está sirve para no sea afectada la espermatogénesis (Pickett, et al, 1989). Véase figura 1 y 2.

Investigaciones realizadas en otras especies mencionan que si la temperatura inter testicular es elevada igual que la corporal durante un intervalo de tiempo ò elevarla a 40°C en un tiempo de 2 horas, esto afectara y causara la muerte a ciertas células germinales en desarrollo dentro de los túbulos seminíferos. Especialmente los espermatoцитos primarios los cual son sensibles aunque también podrán sufrir alteraciones las espermatogonias B y espermátidas (Setchell *et al.*, 1988; Pickett *et al.*, 1989).

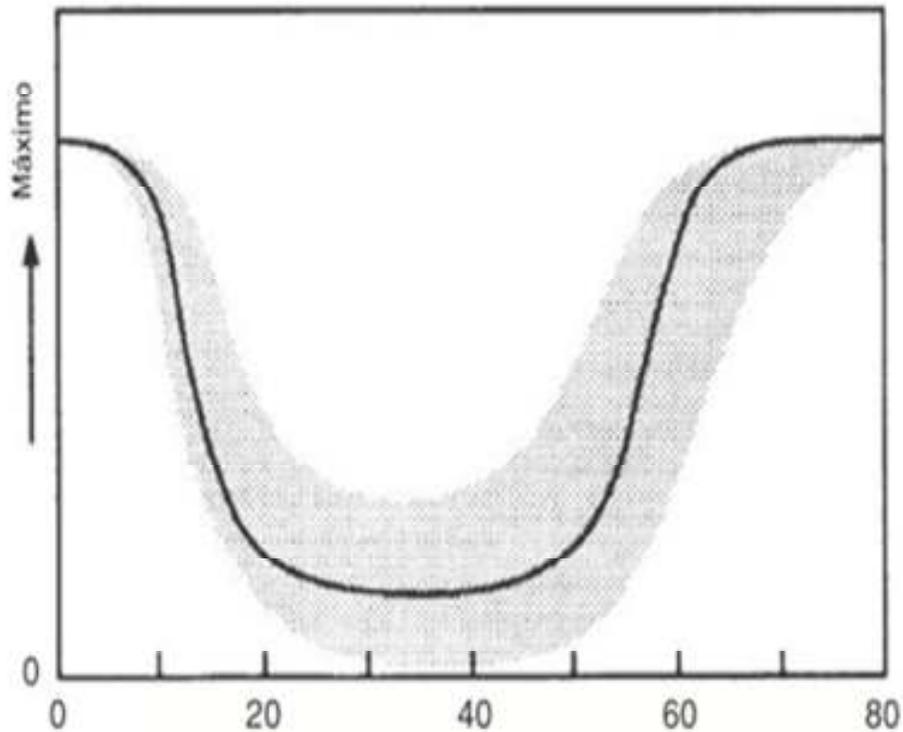
Por consiguiente habrá una disminución transitoria en el número de espermatozoides eyaculados, y para recuperar una concentración tendría que ocurrir 40 días para obtenerlos (Pickett *et al.*, 1989). Véase figura 10

Sin embargo en exposición altas pero en temperaturas de 32°C se necesitarían  $\geq 70$  días después del cese de la temperatura testicular elevada. Para que los espermatozoides de epidídimo no sean afectados. En otras especies la elevación prolongada de la temperatura escrotal afecta la calidad y funcionalidad de los espermatozoides en el epidídimo, (Pickett *et al.*, 1989). Aunque existen datos contradictorios en disminuyen severamente la cantidad y calidad de los espermatozoides en un lapso de 1 a 2 semanas (McKiinnon, 2011). Véase figura 11.



**Figura. 10** Temperaturas en diferentes puntos de los tejidos escrotales y adyacentes medidos por termografía. Mostrando la temperatura en la escala de las áreas designadas. (Tomada de Pickett *et al.*, 1989).

Se a mencionado que en el equino puede tener una fertilidad normal durante 3 a 4 días después de una lesión traumática grave de los testículos como es: la inflamación del escroto o un marcado aumento de la temperatura corporal. Sin embargo el aumento de la temperatura inducida dentro de la cola del epidídimo causan una disminución de la calidad seminal tan pronto o en 4 días más tarde, y esta calidad se refiere a un incremento de anomalías espermáticas (Pickett *et al.*, 1989).



**Figura. 11.** Cambios de patrón en la producción y morfología de los espermatozoides después de 48 horas de una temperatura elevada en promedio de 37.3°C testicular e intra escrotal. (Tomada de McKinnon, 2011).

La termorregulación de los testículos y el epidídimo para mantenerlos a una temperatura de 33°C, depende de la acción combinada del escroto, plexo pampiniforme, túnica de dartos y músculo cremáster. El dartos se contrae para elevar a los testículos dentro de la pared escrotal en respuesta de tiempos fríos, cuando el clima es caluroso este se relaja para hacer al escroto pendular de esa manera maximiza el enfriamiento de la sangre venosa testicular por evaporación

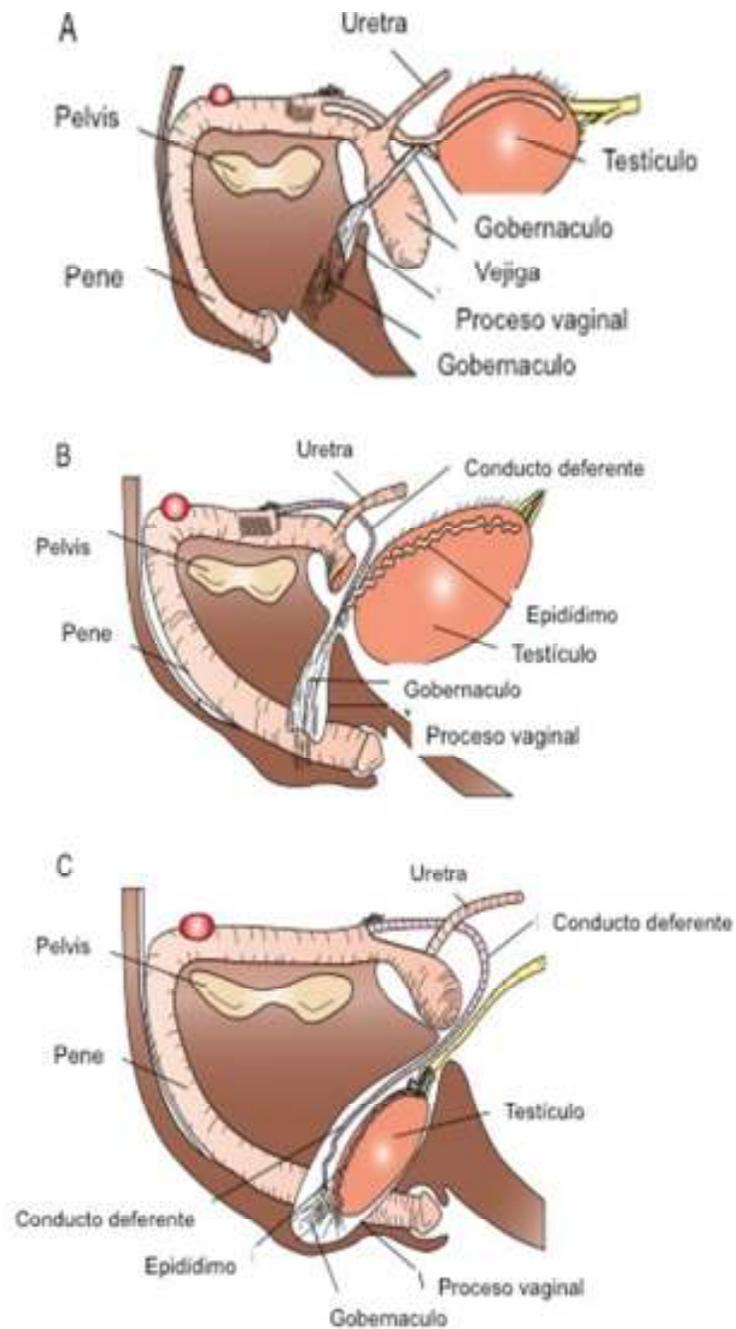
del calor en la piel escrotal y el cremaster puede contraerse para elevar el testículo durante un intervalo corto. El plexo pampiniforme sirve como el mecanismo de radiador cuando actúan los dos músculos antes mencionados. (Setchell *et al.*, 1988; Cêrveny *et al.*, 2005).

Estudios realizados en carneros sobre la temperatura de las gónadas, demostraron que la sangre dentro de las venas superficiales de los testículos se enfría por la evaporación de la humedad escrotal (Setchell *et al.*, 1988).

### **1.1.5 Descenso testicular**

Los testículos descienden a una posición escrotal entre los últimos 30 días de gestación y los primeros 10 días después del parto. Tres estructuras anatómicas están involucradas en el descenso normal, el proceso vaginal, gubernaculo y canal inguinal. La primera es una evaginación del peritoneo en la región inguinal, tiene forma de botella, se da en la pared abdominal y canal inguinal pasando por el escroto. Cuando se da el descenso, esta estructura se divide en dos partes, cuello que esta formado por cordón espermático y una estructura dilatada que contiene las gónadas con sus estructuras convexas. A través de este proceso pasa el propio gubernaculo y asi formando la cavidad vaginal. El gubernaculo cuando esta en etapa fetal se divide en tres partes principales, la unión del testículo con la porción caudal del epidídimo, porción del ligamento de la cola del epidídimo y el proceso vaginal hasta el pliegue del ligamento escrotal. Continuando con el canal inguinal que es una vía de paso entre el anillo inguinal interno y externo. El anillo inguinal interno se forma a partir del músculo abdominal oblicuo interno y el anillo inguinal externo se forma a partir del músculo abdominal oblicuo interno como externo (Amann, 1981<sup>a</sup>). Véase figura 12.

En la siguiente imagen se muestran las etapas del descenso de los testículos al escroto del feto equino.



**Figura. 12.** Etapas del descenso de los testículos al escroto del feto caballo. De un feto: A) 75 días de gestación. B) 175 días de gestación. C) 330 días de gestación. (Tomada de Varner, 1991<sup>a</sup>).

En mitad de la gestación significativamente existe hipertrofia abdominal testicular lo que da como resultado que las gónadas en desarrollo permanezcan próximas al anillo vaginal, el gubernaculo se encuentra en vías de desarrollo y la presión abdominal ayuda en mantener a las gónadas en su lugar hasta finalizar la gestación. A pesar que se mantiene considerablemente el tamaño en toda la gestación, el testículo va teniendo un alargamiento más rápido que el gubernaculo y por esta causa desplazando al epidídimo en el anillo vaginal y canal inguinal, manteniéndolo por un tiempo en esa estructura. La combinación de la dilatación del anillo vaginal y canal inguinal, con la presión abdominal y la contracción del gubernaculo eventualmente van protruyendo del anillo vaginal los testículos. En algunos potros las gónadas pueden descender en la región inguinal y permanecer en ella durante algún tiempo antes de descender completamente en el escroto, existiendo factores hormonales que implican en el descenso testicular de los sementales pero son poco conocidos (Varner, 1991<sup>a</sup>).

Sin embargo investigaciones determinaron que en la rata hay implicación de los andrógenos y la hormona luteinizante (LH) en el proceso del descendimiento de los testículos, de igual manera coinciden con el aumento significativo de las gonadotropinas endógenas. Al parecer la activa en el eje hipotalámico pituitario, mantiene niveles adecuados de LH y varios factores físicos que deben estar presentes para que se produzca el descenso testicular normal (Levy, 1995).

## CAPITULO II

---

### Espermatogénesis

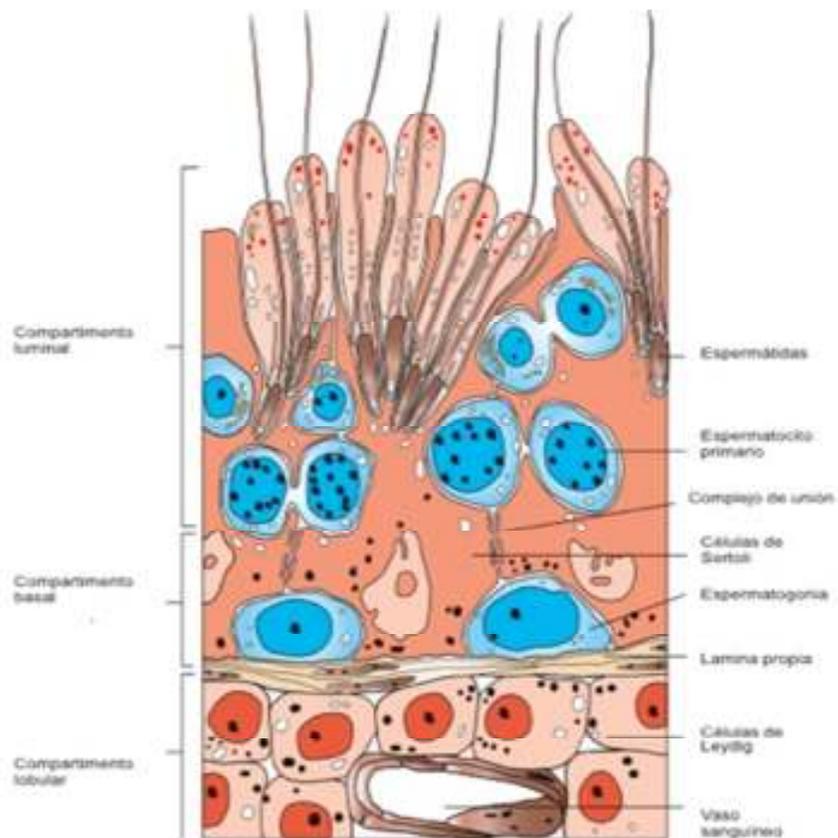
La espermatogénesis es el proceso de producción de los espermatozoides en el epitelio de los túbulos seminífero, durante el cual las células madre de espermatogonias generan espermatoцитos, que son multiplicados y diferenciados para formar espermatozoides. Este gameto es el resultado de numerosas generaciones sucesivas de células que resultan de una secuencia repetible de eventos que se desarrollan dentro de los túbulos. La culminación del proceso es la liberación de células diferenciadas en el lumen de la porción enrollada de los túbulos seminíferos, posteriormente en la parte recta, conductos eferentes y cabeza del epidídimo en el cual van estar almacenados previamente al eyaculado (Bardin, *et al.*, 1994).

#### 2.1 Fases de desarrollo

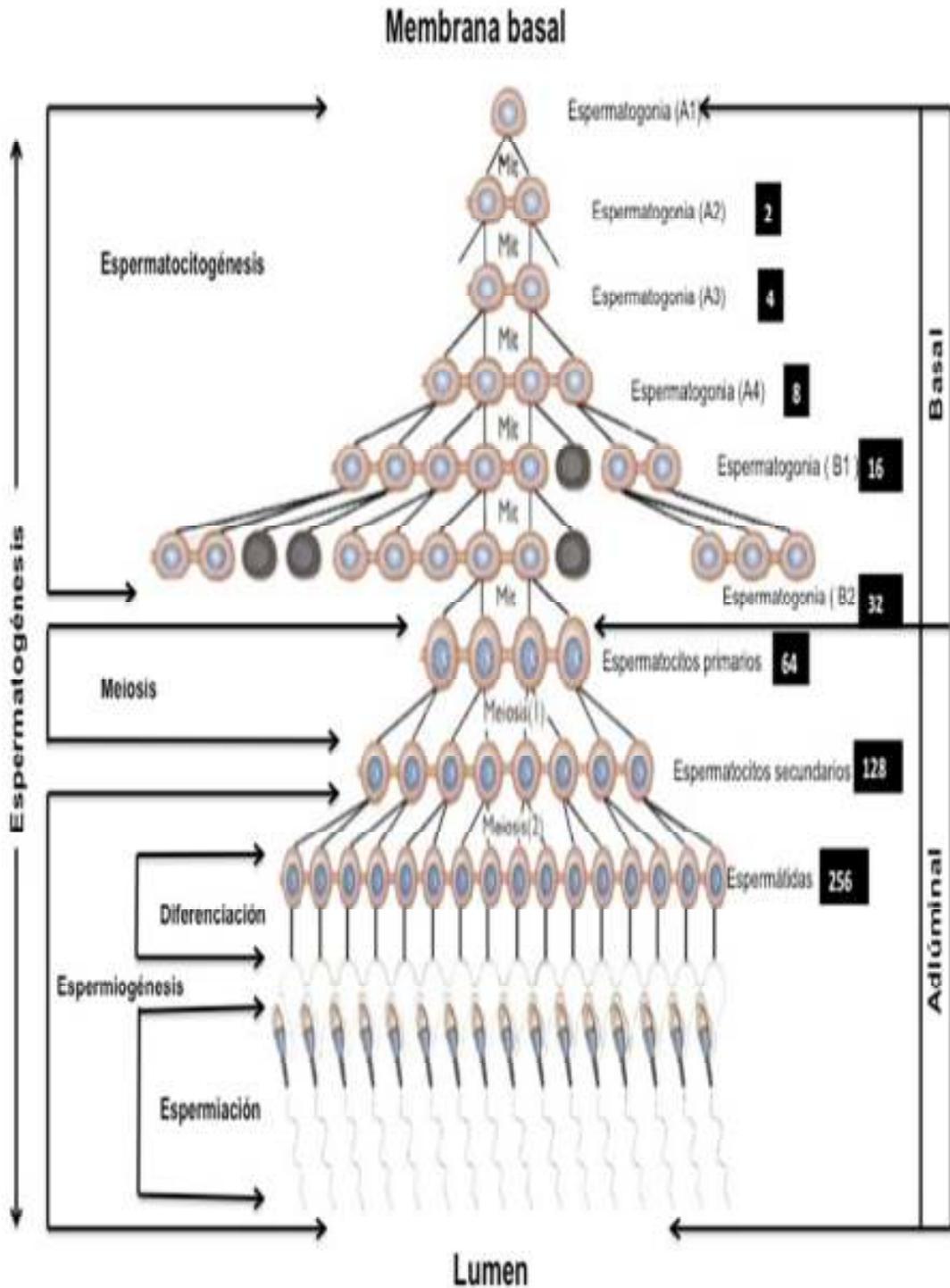
La espermatogénesis se compones de tres fases de desarrollo, espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis. Se ha determinado que estas duran aproximadamente 19, 20 y 18 días respectivamente, dando lugar a una duración total de la espermatogénesis en el equino es aproximado a 57 días (Pickett, 1989; Amann y Hamerstedt, 1993).

Existen dos funciones de la espermatogénesis, división mitótica de las espermatogonias (A1) para producir células hijas comprometidas con el ciclo y repoblar la cantidad de células madre no comprometidas (Ao) para mantener una población de progenitores capaces de continuar con el linaje de células espermatogenicas estas se localizan en el epitelio seminífero cercano a la membrana basal. Las espermatogonias A1 se divide mitóticamente en un tiempo de intervalos regulares de 12 días para diferenciarse en al menos cinco subtipos (A1, A2, A3 B1, B2) antes de la aparición de pre espermatoцитos primarios y leptoteno 3 que se someten a la primera división meiótica. Continuando con la

meiosis se forman los espermatoцитos secundarios que son de forma esférica y al finalizar esta etapa son sometidos a diferenciación morfológica. Como resultado a esta transformación se crean las espermátidas que tienen una forma alargada, núcleo condensado y un axonema que sirve para la motilidad. Cada generación de espermatoгонias y espermatoцитos está íntimamente ligados por puentes intercitoplasmáticos lo cual experimenta división sincrónica y la diferenciación celular. Por consiguiente, siguen avanzando las células sobre el epitelio de los túbulos seminíferos hacia el lumen y quedando lejos de la membrana basal cada vez que exista la división celular sucesiva. Al finalizar la diferenciación celular se continua con la espermiación que viene siendo la terminación o la liberación sincrónica de cada generación de espermátidas en el lumen tubular, esta ocurre en intervalos de 12 días aproximadamente, coincidiendo con el tiempo en la diferenciación celular (Johnson, 1991<sup>a</sup>). Véase figuras 13 y 14.



**Figura. 13** Sección de un túbulo seminífero. (Tomada de Pickett, 1989).



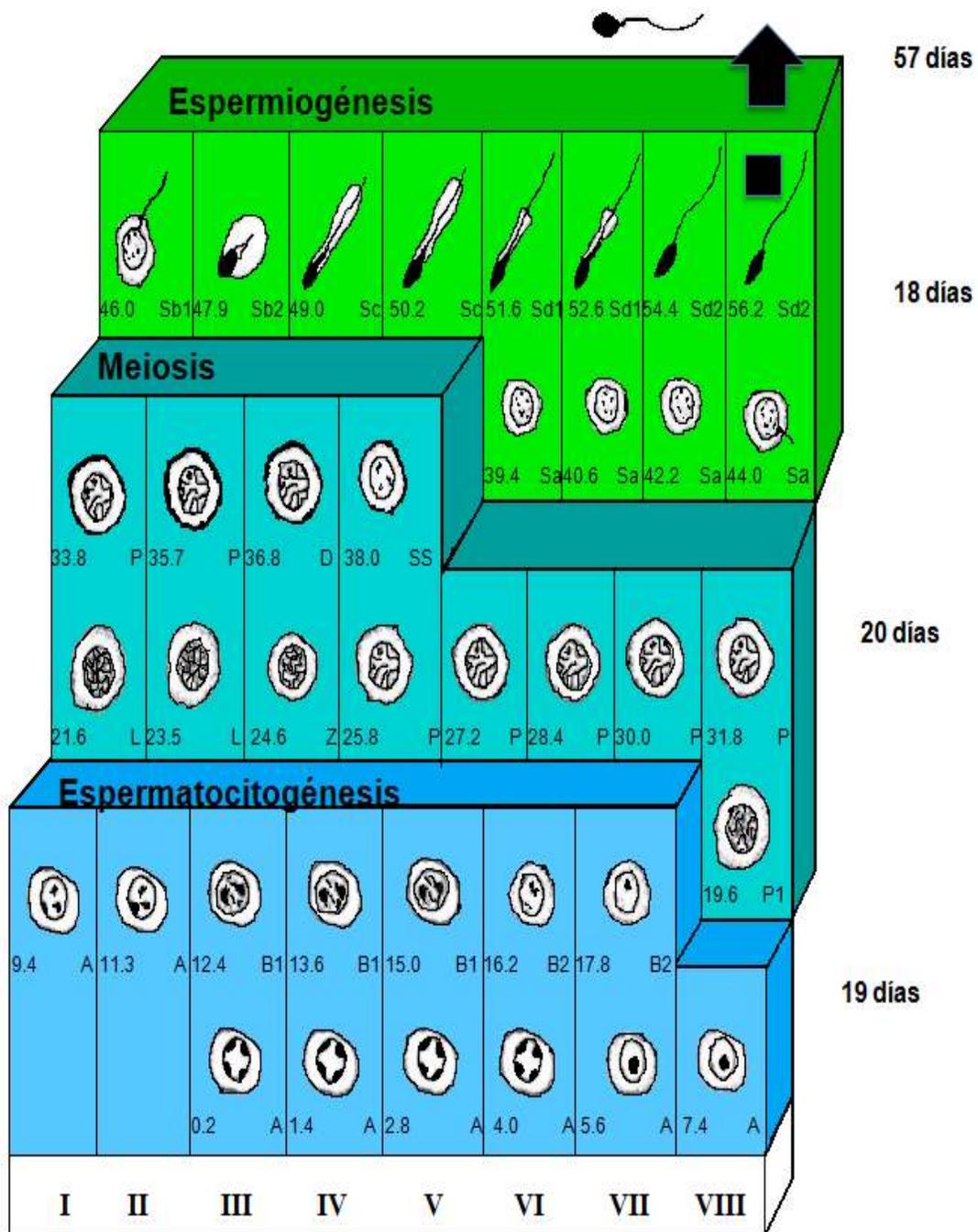
**Figura. 14** Secuencia de la espermatogénesis, desde la espermatogonia A1 hasta formar espermatozoides, para realizarse la espermiación. Va relacionada la con la figura 20. (Tomada de Pickett *et al.*, 1989).

EL número de espermatogonias, espermatocitos y la producción diaria de espermatozoides varía en la estación del año. Además la correlación de la estación y la edad del caballo existe cambios en la cantidad de células de Sertoli y las células de Leydig por lo cual también pueden contribuir a las variaciones en la producción de espermatozoides(Johnson *et al.*, 1989; Johnson, 1991b).

Si embargo se ha asociado que la producción de espermatozoides con el volumen del parénquima testicular se puede medir en la mayoría de las especies domesticas. En sementales equinos la producción es aproximadamente 18 a 20 millones de espermatozoides por gramo de parénquima testicular el cual ha sido estimado en la producción diaria de espermatozoides (Johnson, 1983).

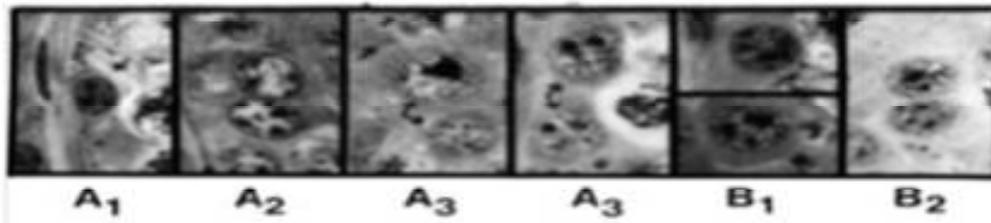
### **2.1.1 Espermatocitogénesis**

La espermatocitogénesis es el primer evento de la espermatogénesis y consiste en las divisiones mitóticas de las espermatogonias en sus diferentes fases, dando como resultado un conjunto de células secuenciales. Las espermatogonias surgen de monocitos posicionados en los túbulos seminíferos, los cuales son precursores y se desarrollan durante el segundo mes de gestación. Se encuentran en la región periférica de los túbulos seminíferos de los adultos, hay dos tipos de espermatogonias, células madre y células germinales. Las progenitoras de las espermatogonias se dividen por mitosis para producir otras del mismo estatus, esto es para continuar con en el linaje a lo largo de la vida adulta del semental, estas repoblar los testículos después de un año de edad, en una etapa avanzada o cuando se da la regresión estacional de la espermatogénesis terminando la temporada reproductiva. En el equino existen cinco subtipos diferentes de espermatogonias caracterizadas por, un pequeño núcleo aplanado (A1), núcleo grande con centros aparentemente vacíos compuestos de una cromatina (A2), la de mayor núcleo grande o fragmentos de nucléolos (A3), óvalo grande con el núcleo esférico por grandes copos de cromatina intermedio o B1, con un núcleo esférico pequeño con pequeñas escamas de cromatina (B2). Cuya división de estas producen espermatocitos primarios (Johnson, 1991<sup>a</sup>). Véase figuras 15 y 16.

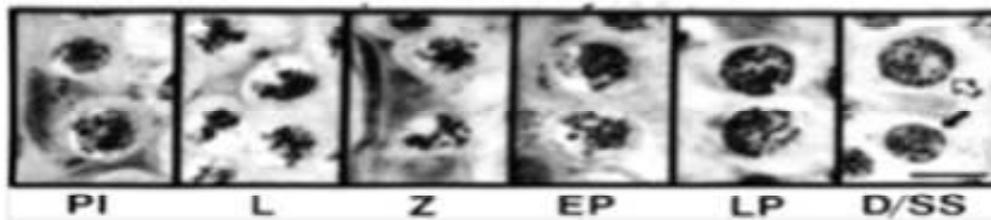


**Figura. 15** Las tres fases de la espermatogénesis: Espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis se encuentran en las ocho etapas del ciclo del epitelio seminífero del equino. (Tomada de Johnson, 1997).

## Espermatogonia

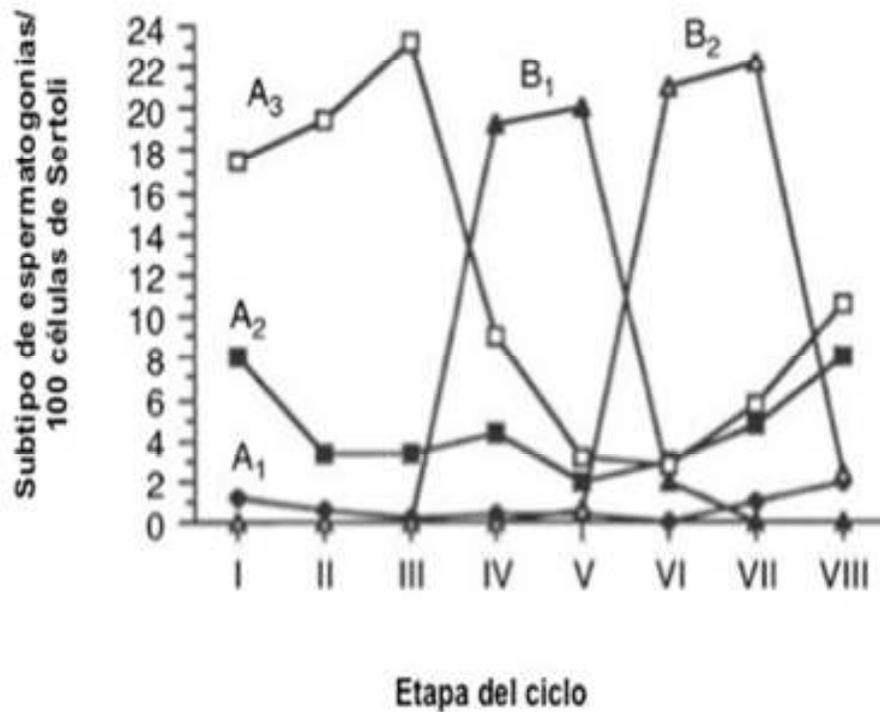


## Espermatocitos



**Figura. 16** Espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios. Diferentes subtipos de espermatogonias (A1, A2, A3, B1 o B2) y espermatocitos preleptoteno (PI), leptoteno (L), cigoteno (Z), temprana o tarde (EP), paquiteno (LP) y diploteno (D), espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios (SS). Las flechas indican las células de interés cuando otras están a la vista y la flecha abierta distingue al espermatocito diploteno primario del espermatocito secundario, indicado por la flecha sólida. (Tomada de Johnson, 1991<sup>a</sup>).

En el equino cada subtipo de las espermatogonias de una sección transversal de los túbulos seminíferos varía cada vez que las fases del ciclo de la espermatogénesis van cambiando. Estas diferencias cíclicas en el número de células se reflejan en la actividad mitótica y la degeneración de los subtipos específicos de las espermatogonias en diferentes etapas del ciclo. Así mismo el número de subtipos de espermatogonias varía con la época del año y el “rendimiento” de espermatogonias B2 por espermatogonias A1 es mayor en la época reproductiva (Johnson, 1991<sup>a</sup>). Véase figura 17.

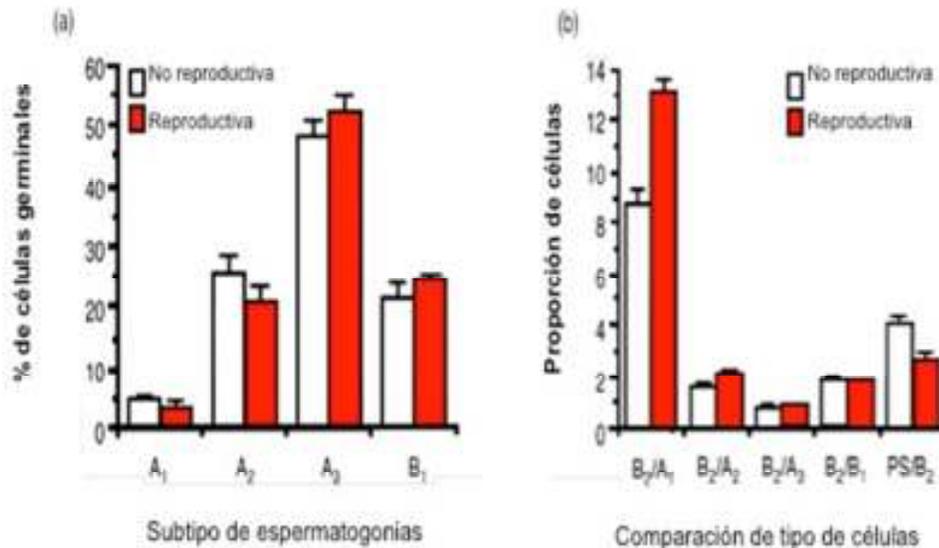


**Figura 17.** Espermatogonias de cada subtipo (A1, A2, A3, B1 y B2) en cada una de las ocho etapas del ciclo de la espermatogénesis en temporada reproductiva. (Tomada de Johnson, 1991<sup>a</sup>).

Sin embargo el número de subtipos de espermatogonias no ha sido confirmado en el equino pero se considera que son de 4-6 para unas determinadas especies. (Hochereau-de Reviere, 1981).

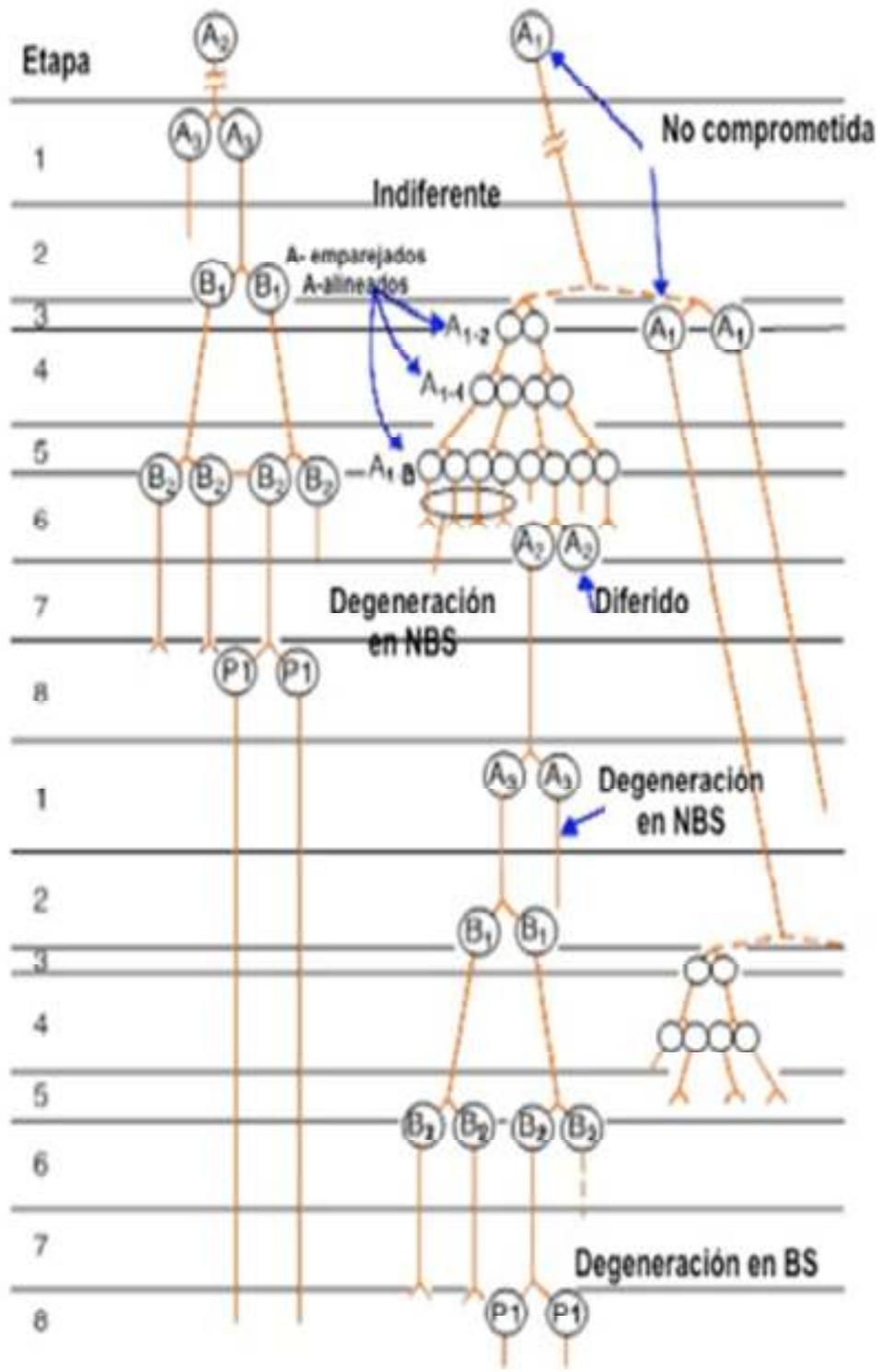
Cuando finaliza la espermatocitogénesis, en la época reproductiva el exceso de espermatogonias B2 se degeneran en lugar de producir dos espermatocitos primarios viables y en la época reproductiva es mayor esta producción. El deterioro estructural es un mecanismo importante para reducir el rendimiento, para mantener un número manejable de espermatocitos y espermátidas (Johnson, 1991<sup>a</sup>).

Basado en datos de cuantificación de espermatogonias A y su actividad mitótica durante las diferentes etapas del ciclo, existe un patrón en el proceso de renovación de estas el semental con un mayor rendimiento a principios de la espermatocitogénesis en el tipo A1, expresado con una mayor producción diaria de espermatozoides en la temporada reproductiva de los equinos (Johnson, 1985; Johnson, 1991b). Véase figuras 18 y 19.



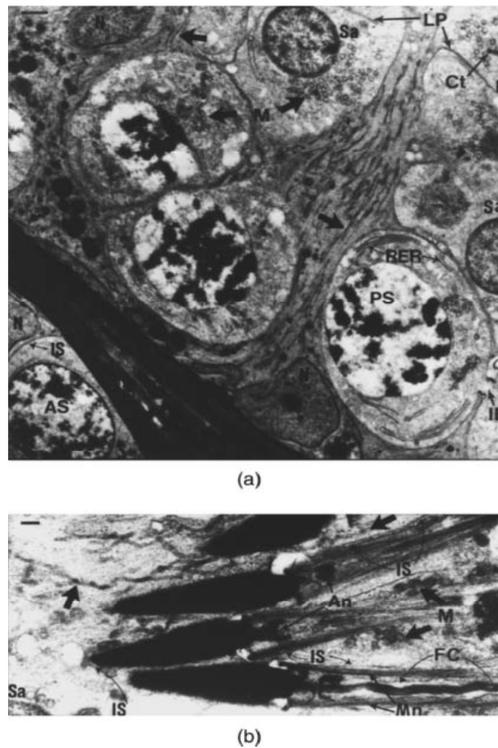
**Figura 18.** Efectos de la temporada en el número de células germinales. (a) el número total de espermatogonias (A1, A2, A3, B1, y B2 respectivamente) y espermatocitos primarios (PS) por testículo. (b) Rendimientos de los subtipos específicos de espermatogonias B2 y espermatocitos primarios en fase de paquiteno. La conversión de A1 a B2 es mayor en la época reproductiva. (Tomada de Johnson, 1991<sup>a</sup>).

El mecanismo por el cual el número de espermatogonias A es estacionalmente modulada en el equino se considera incierto. El número de espermatogonias depende de, el número de células madre por testículo, el régimen de renovación de células madre, número de células divididas de la células madre al espermatocito primario y la cantidad de subtipos específicos de espermatogonias degenerados (Hochereau-de Reviere, 1981). Véase figura 19.



**Figura. 19** Modelo del patrón en la renovación de las células madre equinas. (Tomada de Johnson, 1991<sup>a</sup>; Pickett *et al.*, 1989).

Todas las células germinales incluyendo espermatogonias, espermatocitos, espermátidas o cuerpos residuales, se encuentran unidas entre sí por puentes intercelulares. Estas estructuras dan el paso para desarrollo que puede funcionar para facilitar una sincronía o degeneración en la producción de espermatogonias comprometidas. La diferenciación de espermátidas haploides de que ahora sólo tienen un cromosoma sexual, Fagocitosis y degradación de cuerpos residuales que quedan después de la espermatogénesis (Johnson *et al.*, 2011). Véase figura 20.



**Figura. 20** Células de Sertoli y células germinales de equino. Las regiones (a) basales y apical. Las estructuras etiquetadas incluyen procesos laminares (LP), un puente intercelular (IB), núcleos de espermatocitos primario (PS), las mitocondrias de las células de Sertoli (flechas blancas), las mitocondrias de las células germinales (M), retículo endoplasmático rugoso (RER), núcleo de células de Sertoli (N), el espacio intercelular (IS), espermátida en fase de Golgi (Sa), el desarrollo del flagelo (F), centriolo (Ct), porción del núcleo y tres mitocondrias de una espermátida Sa (Sa), el anillo (An), hombro (Mn) y canal flagelar (FC). (Tomada de Johnson, 1986).

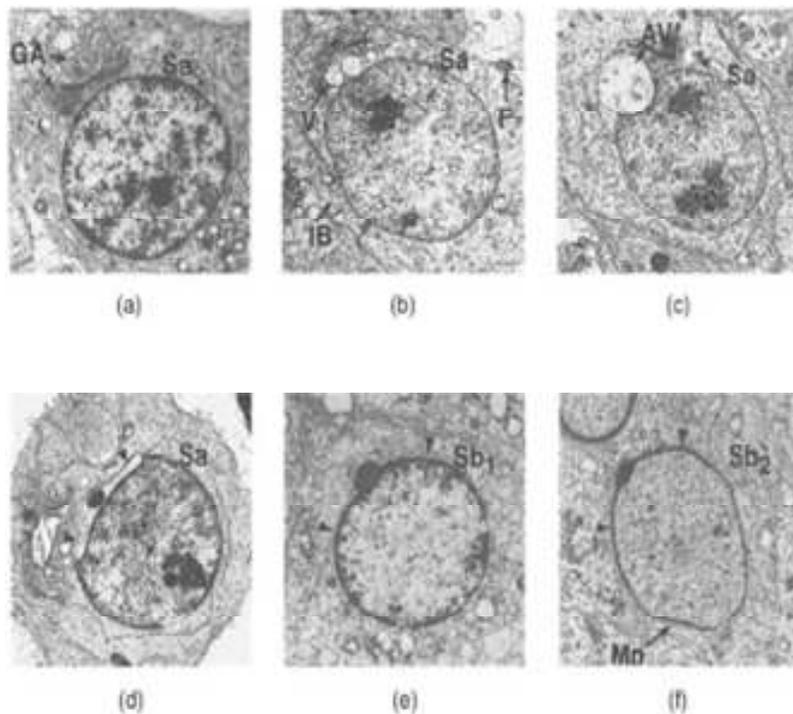
### **2.1.1.1 Meiosis**

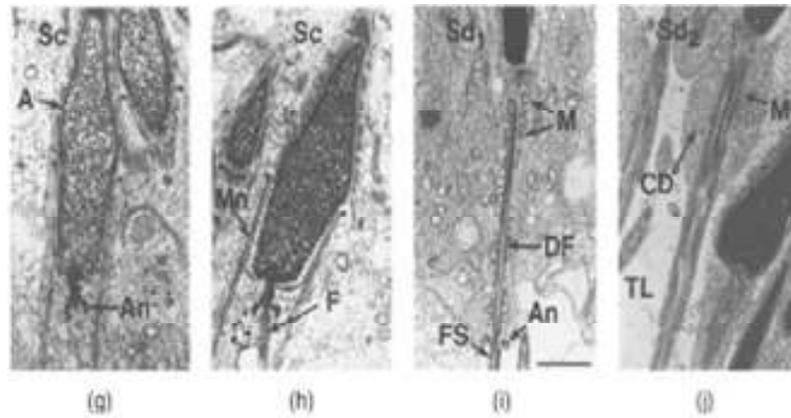
Es el proceso mediante el cual se intercambia material genético entre cromosomas homólogos y se producen espermátidas haploides. Esta fase en el equino están los espermatocitos preleptoteno, lo cuales se originan mediante el proceso de la división mitótica de la espermatogonia B2, esto sin dividir y diferenciarlos, solamente se ve evidente cambios en el tamaño y la apariencia de la cromatina nuclear. Los grumos de cromatina localizados dentro y cerca de la envoltura nuclear en espermatogonias B2 y de espermatocitos primarios preleptoteno se dispersan para producir los filamentos finos de cromatina leptoteno, como estos espermatocitos primarios están en fase de desarrollo. (Johnson *et al.*, 2011).

Inmediatamente que comienza la meiosis los espermatocitos primarios durante la fase de preleptoteno se da la replicación de los cromosoma activamente por síntesis de ADN que dura aproximadamente 18 horas, mediante la incorporación de [3 H]-timidina en el ADN. Los espermatocitos primarios diploteno que sufren una segunda división meiótica, se desarrollan a partir de la fase de paquiteno. La fase cigoteno marca el inicio del intercambio de material genético a través de la pareja de cromosomas homólogos que sigue en la fase paquiteno, los cromosomas sexuales se separan en vesículas pero algunos intercambios se producen entre si. Durante la primera división meiótica los espermatocitos primarios rápidamente se someten a metafase, anafase (separación) y telofase (separación completa), para dar como resultado a los espermatocitos secundarios que contiene el número haploide de cromosomas pero cada uno tiene dos copias unidas de la secuencia de ADN. Ellos tienen en pocas horas un núcleo esférico con escamas de cromatina de tamaño variable y sin síntesis de ADN, la segunda división meiótica se produce para dividir las copias del cromosoma unidos y dar como resultado a las espermátidas con un número haploide de cromosomas. Este proceso de duplicación de los cromosomas seguido por dos divisiones da como resultado la producción de cromosomas haploides en las espermátidas (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras 15,16 y 19.

### 2.1.2 Espermiogénesis

Esta consiste en la diferenciación morfológica de las espermátidas esféricas en espermatozoides con su forma única. Las espermátidas producidas por la segunda división meiótica se diferencian de las células esféricas con núcleos esféricos, estas células se encuentran estructuradas por una cabeza aerodinámica con un núcleo condensado que contiene el genoma, acrosoma y el flagelo que proporciona la movilidad celular. En estas no se da la división celular pero si en mínima parte la síntesis o reparación del ADN, por las proteínas como las histonas de la cromatina. El cambio en el contenido de arginina, cistina y el número de enlaces se disuelven cambios durante y después de la elongación. Esta etapa se divide en cuatro sub etapas, la de Golgi, revestimiento, alargamiento y de maduración que se da dentro de la espermátida, observándose la forma y orgánelos predominantes (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras 21 y 22.



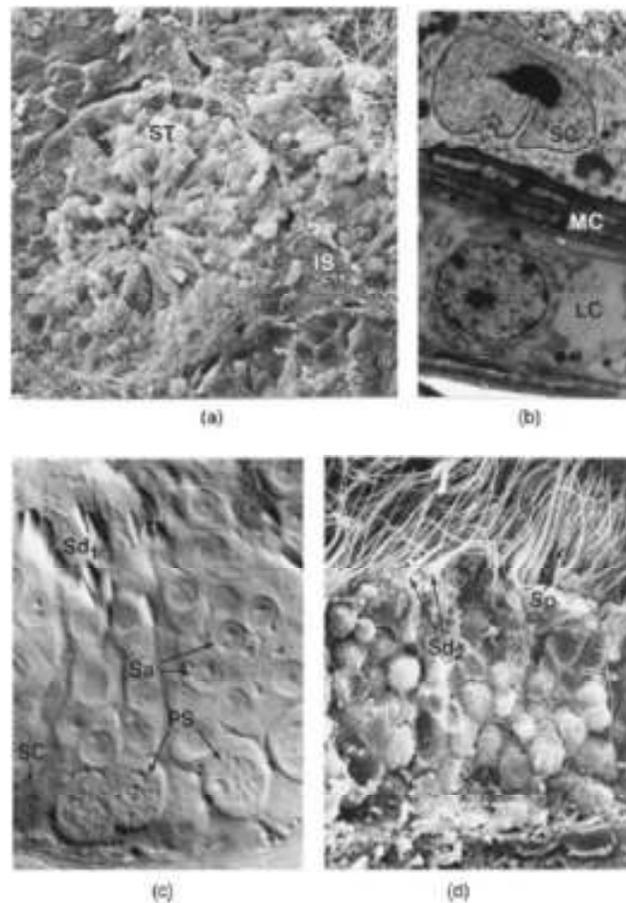


**Figura. 21** Etapas de desarrollo de espermátidas en el equino. Se encuentran representadas en diferentes etapas con las letras: (a-d) espermátidas Sa, (e) espermátida Sb1. (f) espermátida Sb2, (g, h) espermátida Sc, (i) espermátida Sd1 y (j) espermátida Sd2. Las estructuras etiquetadas incluyen un aparato de Golgi (GA), vesículas (V) que se fusionan para formar la vesícula acrosómica esférica (AV), un puente intracelular (IB), el desarrollo del flagelo (F), el desarrollo de la cabeza (Mn), el anillo (An), mitocondrias (M), las fibras densas (DF) y una porción de la luz tubular (TL). (Tomada de Johnson, 1991<sup>a</sup>).

### 2.1.2.1 Fase Golgi

En esta sub fase las espermátidas tienen un prominente aparato de Golgi que produce vesículas unidas a la membrana, en la cara madura de estas cavidades pequeñas se fusionan para formar sacos acrosómicos adyacentes al núcleo y se diferencia con el acrosoma al estar unidas a la membrana que contiene enzimas de esta estructura sobre la medular del espermatozoide. Los centriolos migran a una región cerca de la envoltura nuclear donde el centriolo distal da lugar al desarrollo del axonema; inicialmente se encuentra dentro de la célula de forma esférica, pero más tarde su crecimiento se proyecta fuera del núcleo hacia el lumen. La envoltura nuclear se abre “hendidura nuclear” por la fosa articular para el desarrollo del flagelo. El canal flagelar es una invaginación tubular de la membrana plasmática de la espermátida desde su superficie hasta el anillo situado justo debajo de la unión del flagelo al núcleo, a través del cual el flagelo se extiende hacia el lumen y sus funciones son, facilitar el movimiento de

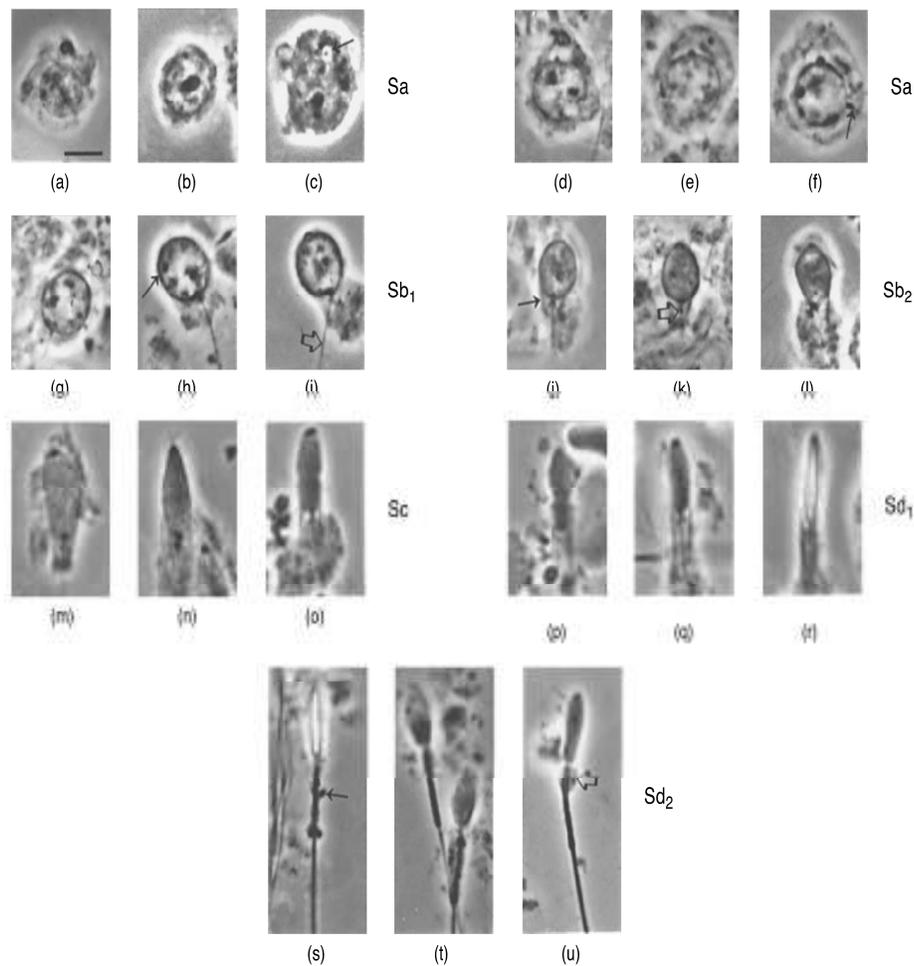
flagelación mediante el contacto de membrana nuclear y dirigir la necesidad de ATP (energía) a la pieza central para estructurar a las mitocondrias, además proporcionar un mecanismo propio para que se puede dar crecimiento del flagelo, alternativamente puede evitar que las mitocondrias se adhieran a las fibras densas del axonema o exterior durante el desarrollo de estas estructuras. El anillo se mueve distalmente en la flagelación (vibración) de las espermátidas en la fase de maduración. (Johnson *et al.*, 2011). Véase las figuras 14, 19, 20, 21 y 22.



**Figura. 22.** Micrografías de los testículos de equino (a, b, c y d). Las estructuras etiquetadas incluyen un túbulo seminífero (ST), tejido intersticial (IT), células de Leydig (CL), células mioides (MC), células de Sertoli (SC), espermatoцитos primarios (PS), espermátidas Sd1 (SD1), espermátidas Sd2 (SD2), y espermatozoide liberado (Sp). (Tomada de Johnson, 1997).

### 2.1.2.2 Fase de revestimiento

Cuando la vesícula acrosómica se aplana y comienza a propagarse para formar una capa sobre el núcleo, el aparato de Golgi se vuelve menos visible cuando se mueve lejos de la vesícula acrosómica, el desarrollo flagelar se hace más evidente ya que se proyecta más allá de la superficie de la célula, el núcleo es todavía esférico (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras 21 y 23.



**Fig. 23.** Fases de las espermatidas equinas. Las flechas indican, (c) un gránulo acrosómica, (f) la primera apariencia distinta de un flagelo, (h) tapón acrosómica, (i) desarrollo del flagelo, (j) primera aparición de la cabeza, (s) mitocondrias alrededor de la pieza intermedia y (u) una gota citoplasmática. (Tomada de Johnson y Thompson, 1983).

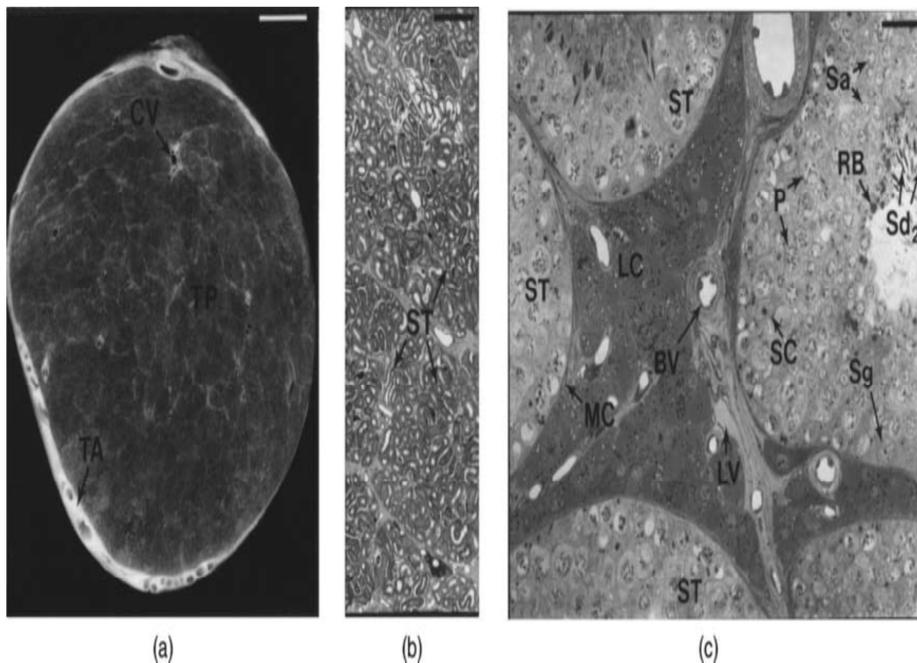
### **2.1.2.3 Fase de alargamiento.**

Sucede cuando se extiende el revestimiento, el núcleo y citoplasma comienzan a alargarse. La gota citoplasmática un orgánulo transitorio se encuentra solo en la espermatida, se compone de los microtúbulos unidos mediante la vinculación de los brazos, forma una funda alrededor de la mitad inferior del núcleo de alargamiento y se extiende hacia abajo fuera del flagelo en desarrollo. En el equino esta estructura permanece en el cuerpo residual que se elimina en la espermiación. En esta especie como en las demás, los espermatozoides no se consideran normales si se encuentran esta estructura residual (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras 20, 21 y 23.

### **2.1.2.4 Fase de maduración**

La última fase de desarrollo de la espermatida se caracteriza por la migración citoplasmática a la cola ya que puede proporcionar un eje que soporta el canal flagelar y la libertad de movimiento durante el desarrollo del flagelo, de hecho la disolución de esta estructura corresponde a la migración del anillo en su lugar permanente de la unión de las piezas intermedias y principales del espermatozoide (el acortamiento y la desaparición del canal flagelar). Las mitocondrias se mueve en torno al flagelo en la región de la pieza intermedia tras la migración del anillo, este proceso parece ocurrir rápidamente, ya que es difícil encontrar una espermatida cuyo anillo ha migrado pero las mitocondrias no han rodeado su parte media. El mecanismo de producción de las nueve fibras densas y la vaina fibrosa del espermatozoide no está clara. La vaina fibrosa es de dos columnas unidas por nervios que se extienden hacia abajo de la pieza principal entre la membrana plasmática y fibras densas exteriores (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras. 20, 21, 22 y 27

Después de la liberación de espermátidas de epitelio seminífero como espermatozoides individuales y libres flotando se conoce como espermiación, la contrapartida de la ovulación en las hembras. El desarrollo de espermátida está unido a su cuerpo residual por tallos citoplasmáticos en la región del cuello, una fracción de este se mantiene en la región del cuello como una gota citoplasmática encontrada en esta se deja atrás cuando el cuerpo residual se fagocita por las células de Sertoli. Sin embargo parece que la acción lisomal dentro del cuerpo residual comienza con la auto degradación (Johnson *et al.*, 2011). Véase figura 22, 23, 24 y 31.



**Figura. 24** (a) Sección transversal completa del testículo equino. (b) sección de baja magnificación histológica (c) una sección histológica de mayor aumento. La estructura incluye la túnica albugínea (TA), vena central (CV), parénquima testicular (TP), túbulos seminíferos (ST), células de Leydig (CL), vasos linfáticos (LV), vasos sanguíneos (BV), cuerpos residuales (RB), espermatogonias (Sg), espermatocitos (Sa) espermátidas alargadas (SD2) y células de Sertoli. (Tomada de Varner *et al.*, 1991b).

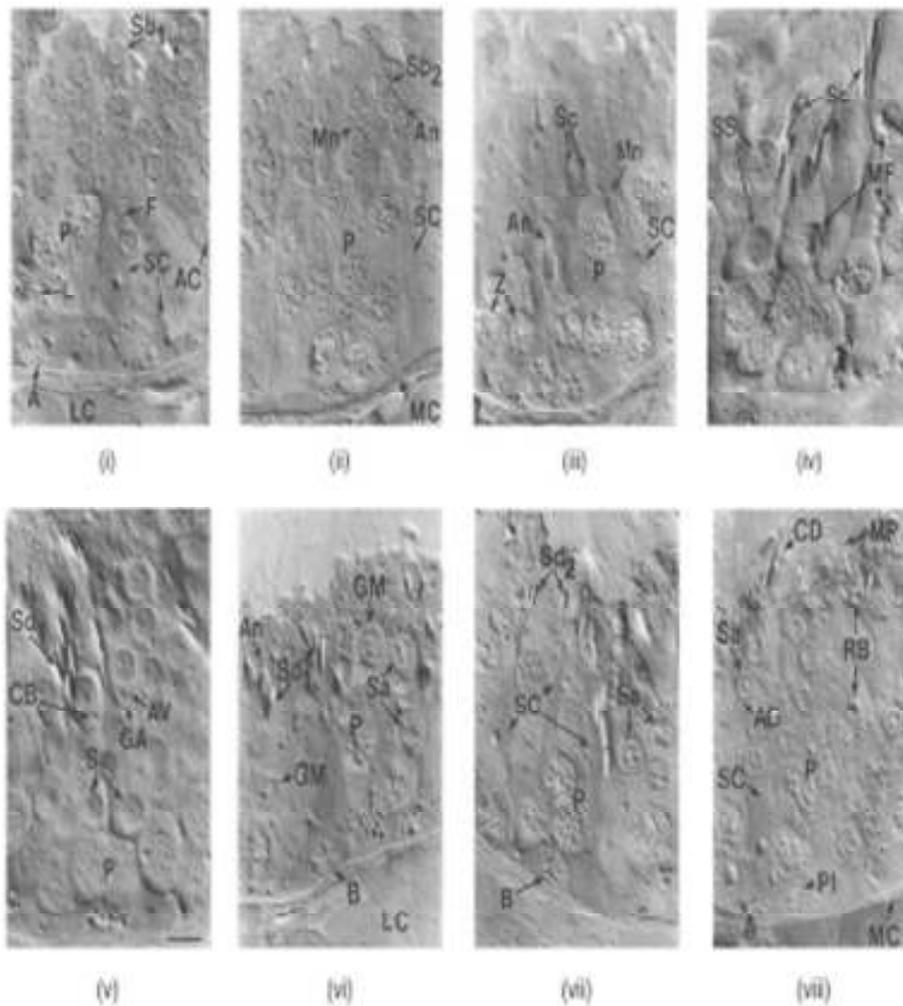
## 2.2 Cinética de la espermatogénesis

### 2.2.1 Etapas del ciclo de la espermatogénesis

Las tres fases de la espermatogénesis se pueden superponer en el ciclo de la misma, el cual es una serie de cambios en una región dada del epitelio seminífero entre dos apariciones de etapas de desarrollo del mismo. Si utilizamos la espermiación como punto de partida, el ciclo sería todos los eventos que se producen entre dos ocasiones consecutivas de espermatozoides liberados de una región del epitelio seminífero (Johnson *et al.*, 2011). Véase figura 15.

Una vez que el proceso de la espermatogénesis se inicia continúa a un ritmo definido, en un ciclo se podrán encontrar distas células en sus diferentes fases. Una etapa en el ciclo de la espermatogénesis se define como una asociación de desarrollo cronológico, cuyo desarrollo difiere de la edad por un múltiplo de la longitud del ciclo (Johnson, 1988).

La división celular aumenta el rendimiento de la espermatogénesis, cada espermatogonia comprometida tiene un rendimiento potencial para producir 64 espermatozoides. La sincronía en la producción de espermatogonias comprometidas no está entre los túbulos y no es simultánea a lo largo de la longitud del mismo, en algún lugar del testículo se encuentran espermatogonias comprometidas en el proceso de cada segundo, por lo tanto cada segundo miles de espermatozoides están siendo liberados en el lumen de los túbulos seminíferos. La clasificación de las etapas del ciclo de la espermatogénesis se ha basado en la presencia y localización de las células germinales específicas. Los cambios asociados con la elongación nuclear, su localización y liberación de espermátidas. Aunque esto se ha estudiado e ilustrado en el bovino, ovino, porcino, equino y con histología convencional, el enfoque revela más detalles del ciclo de la espermatogénesis del equino y sus detalles relativos de las diferencias entre las etapas y esto se concluye en la figura 25 (Johnson *et al.*, 2011).



**Figura. 25** Las ocho etapas (I-VIII) del ciclo del epitelio seminífero equino. (CL) células de Leydig, (SC) células de Sertoli, (MC) células mioides y células germinales incluyendo: (AS) espermatogonias A, (B) espermatogonias B, (PI) preleptoteno, (L) leptoteno, (Z) cigoteno, (P) paquiteno, (P) espermatocitos primarios, (SS) espermatocitos secundarios, (Sa) espermatidas Sa, (SB1) espermatidas SB1, (SB2) espermatidas, (Sc) espermatidas Sc, (SD1) espermatidas SD1, (SD2) espermatidas SD2. Las estructuras etiquetadas incluyen: flagelos (F), acrosoma (AC), cabeza (Mn), anillo (An), figura meiótica (MF), aparato de Golgi (AG), desarrollo de la vesícula acrosómica (AV), órganos cromatoides (CB), agrupación de mitocondrias (GM), gránulo acrosómica (AG), agrandamiento de las piezas intermedias (MP), gota citoplasmática (CD) y cuerpos residuales (RB). (Tomada de Johnson *et al.*, 1990b).

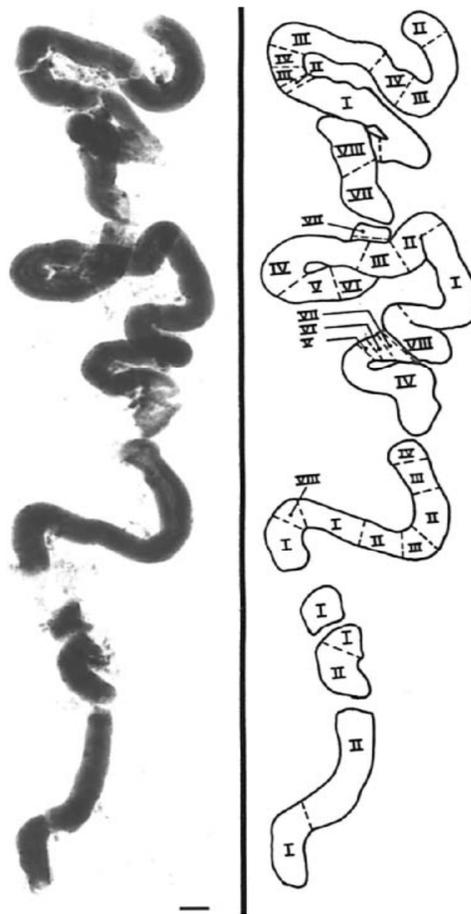
## **2.2.2 Duración del ciclo y de la espermatogénesis**

Como se menciona anteriormente, la longitud del ciclo es la cantidad de tiempo entre las liberaciones consecutivas de espermatozoide y es dictada por la frecuencia de las espermatogonias que acaban de entrar en el proceso. Por lo tanto la duración del ciclo no es arbitraria ni por el hombre. La duración de esta en el equino es de 12 días y para algunas especies son de 9 en el ratón, 8 el jabalí, 8 en el hámster, 10 para el carnero, 9 el mono y el hombre de 13 días (Amann y Ganjam, 1981; Amann, 1986).

La duración de la espermatogénesis es aproximado para cualquiera de las especies estudiadas debido a la dificultad de determinar el punto en el que la espermatogonia A entran en el proceso. Por lo general se ha considerado que es de aproximadamente 4.5 veces la longitud del ciclo para una especie determinada. Esto corresponde a cuatro o cinco generaciones de células germinales que se encuentran en cada etapa del ciclo de la espermatogénesis. La duración de la espermatogénesis puede aproximarse a los 39 días en el porcino, 47 días en el ovino, 61 días en el bovino, 74 días en el humano y 57 días en el equino (Amann, 1986).

## **2.2.3 Ola espermatogénica**

La ola espermatogénica se refiere a la distribución de etapas consecutivas a lo largo de la longitud de los túbulos seminífero en un momento dado. La secuencia del orden es inevitable. El origen de la onda es desconocido pero es el resultado de la división sincrónica pero no simultánea de espermatogonias de células madre en el segmento tubular adyacentes. Funciona como un mecanismo para asegurar una liberación constante de los espermatozoides de esta manera reduce la competencia por hormonas y asegurar un constante flujo de fluido seminífero tubular para mantener el vehículo para transporte de los espermatozoides (Johnson *et al.*, 2011).

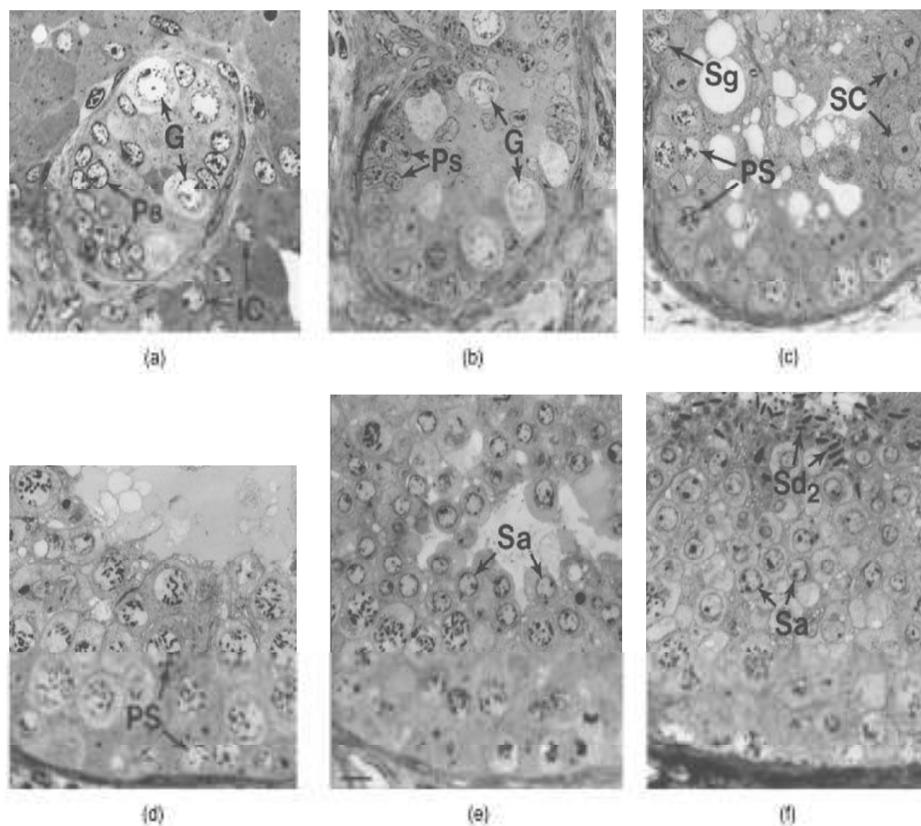


**Figura. 26.** Etapas consecutivas a lo largo de la longitud de los túbulos (Tomada de Johnson *et al.*, 1990b).

### 2.3 Establecimiento de la espermatogénesis

El establecimiento de esta tarda mucho tiempo en los animales domésticos. El proceso se inicia antes del nacimiento cuando las células germinales primordiales se someten a varias divisiones en las gónadas para producir gonocitos dentro de los cordones sexuales fetales. Los cordones sexuales se componen de los gonocitos ligeramente teñidos y las células de soporte de tinción oscura que se diferencian en células de Sertoli después del nacimiento. Los gonocitos persisten en los cordones sexuales masculinos hasta antes de la pubertad, momento en el que se diferencian y se dividen para producir

espermatogonias. El establecimiento de la espermatogénesis en el ovino la espermatogonias proliferan para producir espermatocitos y espermatidas en un rango de 100 a 125 días semental y se de concluye a los 150 días. En el bovino se produce durante las 28 semanas de nacido y con observación de espermatozoides hasta las 32 semanas. En el equino a los 12 meses de edad postnatal, las espermatogonias y espermatocitos primarios están presentes seguidos de espermatidas esféricas a los 16 meses y espermatidas maduras a los 36 meses. (Johnson *et al.*, 2011). Véase figura 27



**Figura. 27** Fases en la creación de la espermatogénesis en el equino. Estas fases se extienden desde (a) 270 días de gestación, (b, c) 10 a 12 meses, (d, e) 16 meses y (f) de 38 meses de edad. Se encuentran en las imágenes células intersticiales (IC), células pre-Sertoli (Ps)m gonocitos (G), células de Sertoli (SC), espermatogonias (Sg), espermatocitos primarios (PS), espermatidas Sa (Sa) y espermatidas Sd2 (Sd2). (Tomada de Johnson *et al.*, 1991).

El establecimiento de la espermatogénesis ocurre aparentemente al azar en el testículo de la mayoría de las especies. El equino es una excepción en que el desarrollo de los túbulos seminíferos se inicia en la parte central de los testículos y se mueve a las regiones periféricas. Como resultado de este peculiar desarrollo regional, fue observado a través de un testículo de 1 equino de 1 año de edad teniendo el parénquima testicular claro con la expansión de los túbulos seminíferos en el centro y oscuro en las regiones periféricas, donde predominan las células degeneradas del intersticio. Este desarrollo se da primero en el testículo derecho (Johnson *et al.*, 2011).

En el equino como en otras especies domésticos la máxima eficiencia de la espermatogénesis se obtiene antes de la producción máxima de espermatozoides por testículo, con base en las características seminales, la pubertad ocurre en el 1ro y 2do años de edad. Una vez que se ha completado la espermatogénesis, la eficiencia del rendimiento tarda varios meses en darse y luego se estabiliza el nivel en edad adulta. (Naden *et al.*, 1990; Clemmons *et al.*, 1995).

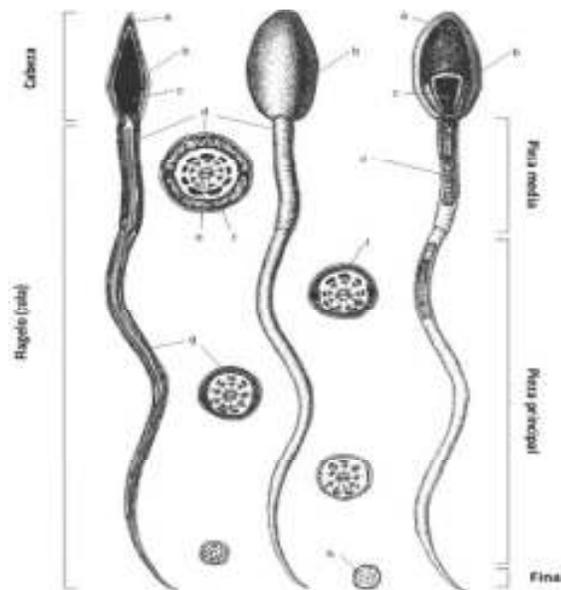
## **2.4 El espermatozoide**

La descripción estructural del espermatozoide puede ser útil para entender la serie de eventos que se encuentran durante la espermatogénesis.

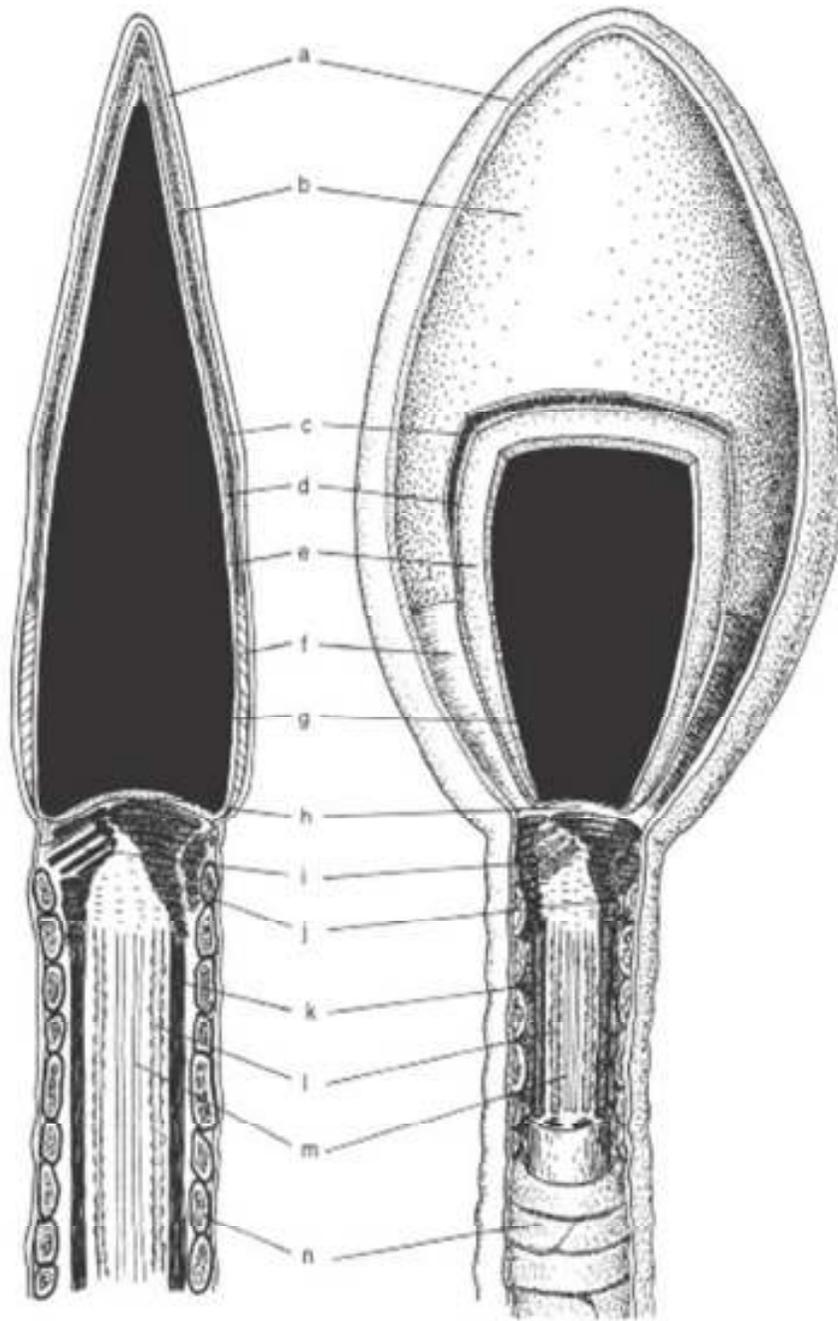
Un espermatozoide se compone de una cabeza y flagelo, generalmente la estructura en el equino es similar que las descritas en las especies domesticas. La cabeza esta conformado por un núcleo que ocupa la mayor parte de la estructura que contiene material genético y en su superficie anterior como capuchón esta el acrosoma que cuenta con enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración de las vestiduras del ovocito durante la fecundación. En esta especie el flagelo es abaxial, es decir que no se encuentra unido al eje central de la base de la cabeza esto no es considerado como malformación, pero si como anomalía en otras especies, esta estructura se conforma por la región del cuello donde se une a la cabeza denominada como la pieza central, la cual

contiene mitocondrias para producir energía además de nueve fibras densas y la pieza distal donde permanecen el centriolo para dar lugar axonema durante el desarrollo del flagelo. Un axonema está compuesto de un doblete par y microtúbulos centrales, los cuales continúan a través de la pieza intermedia, principal y final, se encuentra compuesto por nueve fibras densas y membrana plasmática, la función principal de las fibras densas sigue siendo incierto. (Olso y Sammons, 1980). Véase figuras 28, 29 y 30.

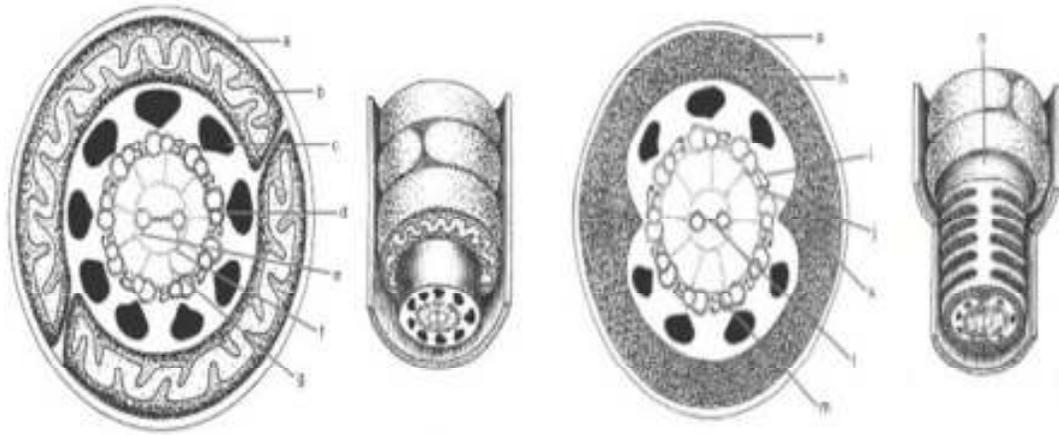
Sin embargo se ha propuesto que las fibras funcionan como estructuras elásticas pasivas, las cuales son similares a un anillo que marca el final de la pieza intermedia y el comienzo de la pieza principal. Esta última área es la proporción más larga del flagelo que contiene una vaina fibrosa cuenta con estructuras en forma de nervios para facilitarle el movimiento de flexión que desaparece cerca del extremo distal de la pieza principal (Fawcett, 1975) Véase figuras 28 y 29.



**Figura 28.** Espermatozoide equino. Se observan sin cortes (centro), vista sagital media (a la izquierda) y parcialmente disecado. Se muestra con sus diferentes estructuras, cabeza, flagelo; pieza intermedia, principal y final. (a) acrosoma, (b) membrana plasmática, (c) núcleo, (mitocondrias, (c) axonema, (f) fibra externa densa, (g) vaina fibrosa, (h) microtúbulos del axonema. (Tomada de McKinnon *et al.*, 2011).



**Figura 29.** Ampliación de la figura 15. Vista sagital del espermatozoide equino parcialmente disecado. (a) membrana plasmática, (b) acrosoma, (c) membrana acrosómica externa, (d) membrana acrosómica interna, (e) envoltura nuclear, (f) cuchilla post acrosómica, (g) núcleo, (h) lamina basal subyacente, (i) centriolo proximal, (j) columna segmentada, (k) fibras densas externas, (l) dobletes exteriores del axonema, (m) para central de microtúbulos dentro del axonema, (n) mitocondrias. (Tomada de McKinnon *et al.*, 2011).

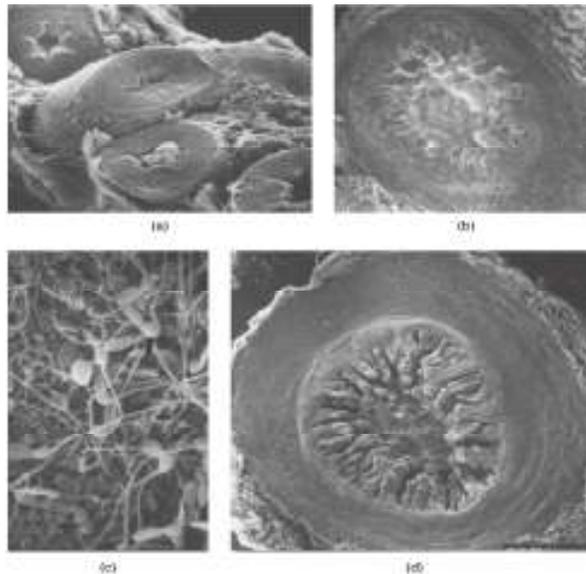


**Figura 30.** Ampliación de la sección transversal de la pieza principal e intermedia de espermatozoide equino. (a) membrana plasmática, (b) mitocondrias, (c) fibra densa externa, (d) doblete del axonema, (e) par central de microtúbulos del axonema, (f) envoltura del par central de micotúbulos, (g) brazo radial, (h) vaina fibrosa, (i) brazo de dineína exterior, (j) parte interna del brazo de dineína, (k) columna de la vaina fibrosa, (l) puente de conexión entre el par central de microtúbulos, (m) enlaces de nexina, (n) anillo. (Tomada de McKinnon *et al.*, 2011).

Existen diferencias en los espermatozoides entre especies en cuanto al tamaño y forma, como en el sus scrofa (jabalí) y caprino cuentan con una cabeza aplanada. (Garner y Hafez, 1980). En el caballo estas características son semejantes con el del humano y otros primates (Johnson *et al.*, 1980; Johnson, 1982). Se a determinado que la mayoría de las especies los espermatozoides no se encuentran maduros cuando son liberados en los túbulos seminíferos, estos requieren cambios morfológicos y fisiológicos para llegar a este propósito. Estos procesos se realizan en el epidídimo, para que sean móviles y compatibles con la fertilización. Justo antes de la espermiación de las espermatidas como espermatozoides el exceso de citoplasma que no se elimina en esta etapa se acumulada en el extremo del cuello del flageló en desarrollo. Este citoplasma se convierte en la gota citoplasmática, localizada en la posición proximal cerca de la cabeza de los espermatozoides liberados (Olso y Sammons, 1980). Véase figura 23.

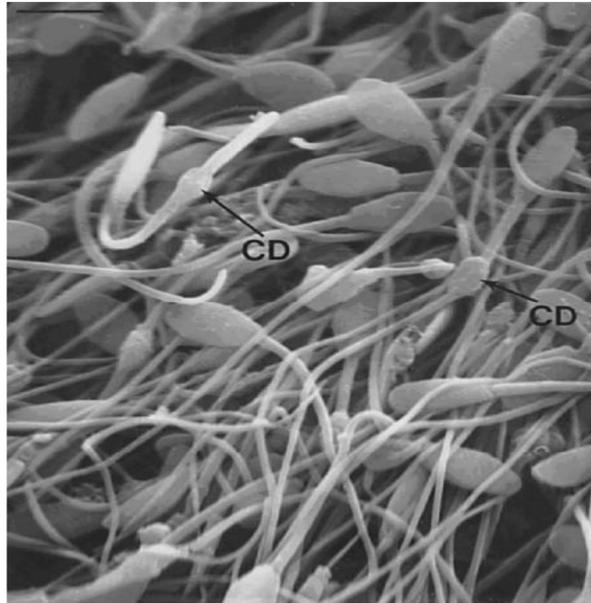
## 2.5 Tiempo entre la espermatogénesis y la aparición de los espermatozoides en el eyaculado

El intervalo necesario para que los espermatozoides sean transportados a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo es aproximadamente de 4 días, pero el transporte a través de la cola del epidídimo se ve afectada por la frecuencia de la eyaculación. En sementales sexualmente inactivos los espermatozoides a menudo permanecen en la cola durante unos 10 días y en activos este intervalo se reduce a 6-8 días, por lo tanto en un machos sexualmente activos el tiempo de transito del espermatozoide a través de todo el epidídimo es de 10 a 11 días (Johnson *et al.*, 2011). Véase figura 31.



**Figura. 31** Espermatozoides en el conducto del epidídimo. (a) Varios perfiles del epitelio y la luz de la cabeza del epidídimo. (b) Sección transversal del cuerpo que tiene una pared más gruesa que la cabeza del epidídimo. (c) Perfil de los espermatozoides en el cuerpo proximal del epidídimo donde se produce la translocación de la gota citoplasmática. (d) Sección transversal de la cola del epidídimo que tiene un gran lumen y una pared muscular gruesa que expulsa espermatozoides a través de los conductos deferentes. (Tomada de Johnson *et al.*, 1978).

La espermatogénesis como tal en el semental equino es de 57 días, lo que es el número de días entre una etapa de desarrollo de una célula germinal y el momento en que aparecen los espermatozoides en el eyaculado. El número de días entre el trastorno testicular y la aparición pobre en la calidad seminal se puede utilizar para calcular la edad de desarrollo de las células germinales e identificar específicamente (Johnson *et al.*, 2011). Véase figuras 15 y 32.



**Figura. 32** Eyaculado de espermatozoides equino. La mayoría de los espermatozoides son normales, sin embargo la gota citoplasmática distal (CD) en algunos espermatozoides siguen unidos en la zona del anillo de la cola del espermatozoide. (Tomada de Johnson *et al.*, 1978).

## 2.6 Interacción hormonal

El tiempo durante el cual el espermatozoide se desarrolla y la longitud del ciclo de la espermatogénesis no están influidos por las hormonas en los sementales regulares o hipofisectomizado. Sin embargo en la degeneración de células germinales y la producción diaria de espermatozoides están influidas por las hormonas (Parvinen, 1982; Hochereau- de Reviers *et al.*, 1987; Courrot, 1988; Amann, 1989).

La iniciación de la espermatogénesis se cree que depende en gran medida de las concentraciones de la hormona luteinizante (LH), FSH y testosterona. Altas producciones de LH estimulan la producción de testosterona por las células de Leydig en yuxtaposición con los túbulos seminíferos (Johnson *et al.*, 2011).

El control hormonal de la espermatogénesis difiere entre las especies. En el ovino la FSH y LH son necesarias, también pueden tener un papel directo en la regulación proliferativa de la espermatogénesis. Por lo contrario la espermatogénesis se puede mantener por la testosterona solo en la rata. En el equino el fotoperíodo estacional impulsa concentraciones séricas de FSH, LH, testosterona y prolactina fueron más altas en el verano. En la etapa reproductiva el peso testicular, los niveles de testosterona intratesticular, número de células de Sertoli, células de Leydig, espermatogonias y la producción diaria de espermatozoides es más altas. (Clay *et al.*, 1988; Courrot, 1988; Johnson y Tatum, 1989; Pickett *et al.*, 1989; Johnson, 1991b).

## **2.7 Transporte de los espermatozoides**

Como los espermatozoides se producen en los túbulos seminíferos y se liberan en la espermiación en el lumen tubular siguiente, son transportados a la red de testis, esta zona es una ampliación ramificada. Ambos extremos de cada túbulo seminífero desembocan en la red. La red de testis se fusiona con 10 a 20 conductos eferentes que a su vez se fusiona con el conducto de la cabeza del epidídimo. Los conductos eferentes se vuelven progresivamente más tortuosos a medida que alcanzan la cabeza del epidídimo y se forman en un solo conducto del epidídimo en donde los espermatozoides son almacenados (Setchell, 1994).

## CAPÍTULO III

---

### Evaluación espermática

El objetivo general de la evaluación de los espermatozoides es para determinar la fertilidad de los sementales con espermatozoides de epidídimo, se analizarán los aspectos microscópicos (Card, 2005; Colenbrander, 1992; Magistrini, 1997; Petrunkina, 2007; Graham, 2005).

La determinación de la fertilidad del semental podría mejorar si los parámetros adicionales basados en la características funcionales de los espermatozoides son considerados

Existen varias técnicas e instrumentos diferentes que se han desarrollado en un esfuerzo para asegurar un objetivo de la: evaluación de la concentración y motilidad. Sin embargo, estos métodos como: micrografía, video micrografía, espectrofotómetro o análisis computarizado se consideran demasiado tedioso y costosos para un uso rutinario. Los sistemas informáticos se encuentran actualmente en vigor en muchos laboratorios de referencia, con la intención de evaluar objetivamente las características de movimiento de los espermatozoides. A pesar de la disponibilidad comercial de varias generaciones de sistemas de análisis asistida por ordenador CASA de >20 años, su presencia no ha aportado la prueba definitiva para medir el potencial de fertilización de los espermatozoides (Amann y Katz, 2004).

Sin embargo, existen técnicas que han evalúan subjetivamente a los espermatozoides en su motilidad, morfología y se puede determinar la viabilidad de los gametos. Esta técnicas como son la evaluación visual (microscopio) de la morfología con hemocitómetro y motilidad. Por su accesibilidad y su bajo costo son utilizadas frecuentemente en los laboratorios de procesamiento de semen (Julie, 2011).

## **3.1 Aspecto microscópico**

### **3.1.1 Concentración**

La determinación de la concentración de espermatozoides, es un procedimiento fundamental cuando se realiza un examen completo en un buen estado de la reproducción o la preparación de los espermatozoides para inseminación artificial, la concentración de espermatozoides por lo general se presenta en millones / ml (ejemplo, 225 millones/ ml) se multiplica por el volumen (en ml) para obtener el número total de espermatozoides en la colección designado como miles de millones (ejemplo, 12.5 billones). En los laboratorios de reproducción los dos métodos más utilizados habitualmente para el recuento de espermatozoides son máquinas basadas en espectrofotómetro o el hemocitómetro tradicional (Julie, 2011).

#### **3.1.1.1 Hemocitómetro**

El hemocitómetro fue inventado por Louis Charles Malassez y fue diseñado originalmente para el recuento de células rojas de la sangre, se compone de un grueso cristal portaobjetos con son dos muescas rectangulares o “cámaras” alineadas verticalmente en el centro de la diapositiva, las cámaras están grabadas por láser en forma de una rejilla de líneas perpendiculares. Una muestra de espermatozoides en la pipeta diluido se carga por la acción capilar en la cámara y el número de espermatozoides dentro de la red de conteo determinada, esta tiene una profundidad y tamaño, relativamente un volumen específico, por lo que la concentración de las células dentro de este volumen conocido se puede traducir en la concentración de la muestra original (Julie, 2011).

Existe un número de diferentes tipos de hemocitómetro que se han desarrollado; el más comúnmente utilizado para el recuento de las células de espermatozoides es el hemocitómetro de Neubauer mejorado, a pesar de que se considera el estándar de oro para la determinación de la concentración de espermatozoides el hemocitómetro adolece una serie de limitaciones, tales como la variación entre diferentes hemocitómetros (Christensen *et al.*, 2005) y la habilidad técnica del operador (Brazil *et al.*, 2004).

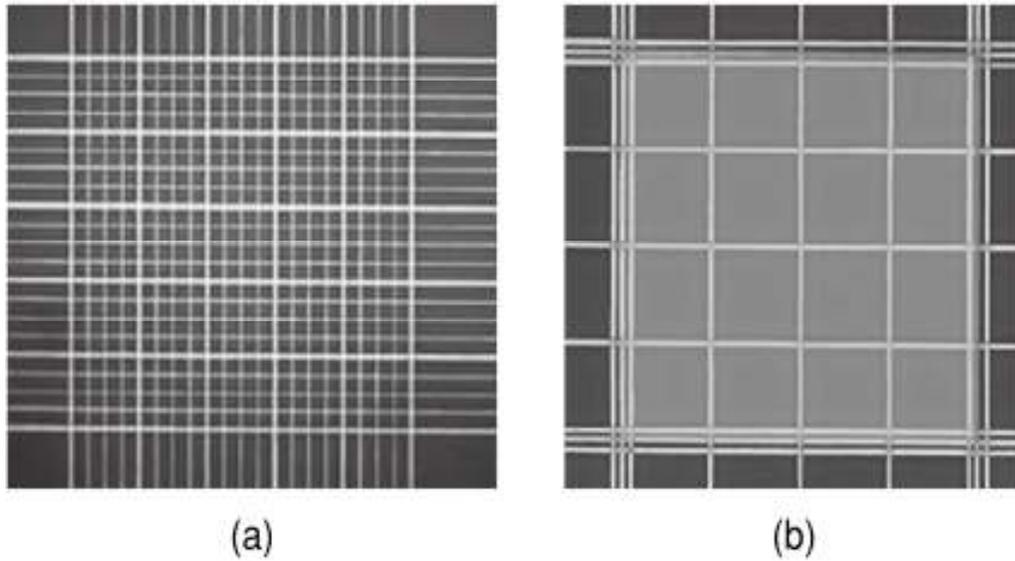
Se determinó que no sólo una variación considerable entre los técnicos sino también la variación entre pipetas, cámaras son variantes significativos cuando son utilizadas por el mismo técnico, se prevé que las diferencias de medias es de alrededor del 20% de la concentración realizada por el mismo técnico, en consecuencia se ha determinado que al menos cuatro cámaras deben ser contadas con el fin de obtener un alto nivel de precisión y repetitividad (Christensen *et al.*, 2005).

#### 3.1.1.1.1 Protocolo para la realizar conteo mediante hemocitómetro

1. Diluir la colección de espermatozoides 1:100 (20 µl : 1.98 ml), ya sea en 10% de formalina o 0.5 de citrato de sodio, asegurándose de que la muestra se mezcle bien antes de transferir una parte de alícuota y limpie la punta de la pipeta con una sanita antes de transferir el semen diluido ( a fin de evitar la introducción de volumen adicional.
2. Asegurarse de que el hemocitómetro y cubreobjetos estén limpios, para después colocarlo uno sobre otro.
3. Mezclar a la muestra diluida, balanceando la punta de la pipeta en la parte superior de la cámara de hemocitómetro y liberar lentamente el semen diluido sobre la misma, lo que permitirá que se llene por capilaridad, tenga cuidado de no levantar el cubreobjetos durante el deposito en la cámara y no desborde la solución, mezcle de nuevo la muestra y cargue la segunda cámara.
4. Permitir que la muestra se asienta durante unos minutos en el hemocitómetro, es preferible dejarlo estabilizado dentro de una cámara de humedad para que la muestra no se seque. Una cámara de humedad

simple se puede hacer mediante la colocación de una pieza de filtro de papel húmedo en el fondo de una placa de búsqueda de embriones y el hemocitómetro descansando sobre dos pajillas de 0.5ml utilizadas para el semen congelado.

5. Coloque el hemocitómetro en el microscopio (objetivo de 10x) buscando la red central, el sistema central de interconexión se encuentra a una disposición de 5 x 5 cuadrantes, cada cuadrante está dividido posteriormente en 4x4 cuadrados más pequeños. Véase figura 33a.
6. Las fronteras de los 25 cuadrantes grandes se definen por tres líneas continuas, la línea central presenta el límite del área de conteo, todas las cabezas de los espermatozoides se cuentan que tienen más de la cabeza del espermatozoide dentro del área sombreada. El espermatozoide que se encuentre exactamente a la mitad del borde de la zona sombreada, se debe de contar sólo las cabezas que se encuentre en las líneas superiores en izquierdas del cuadrante lo que impide contar el mismo espermatozoides dos veces en las plazas adyacentes. Véase figura 33b.
7. Los espermatozoides que se encuentren dentro de los 25 cuadrantes se deben de contar, después de haber terminado de contar la primera cámara se debe de contar la segunda de la misma manera que la primera para poderse sumar entre si y sacar la media, el valor de la muestra debe ser en millones /ml. La fórmula se describe a continuación: Los 25 cuadrados grandes representa un área de 1mm cuadrado, la profundidad del hemocitómetro es de 0.1mm, por lo tanto el volumen por encima de los 25 cuadros es de 0.1µl y todo se multiplica ( $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1$ ). para obtener la concentración en millones / ml de la muestra original se multiplica en número de espermatozoides de los 25 cuadrados por 10000 ( $1\text{ml} = 1000\mu\text{l} \div 0.1 \mu\text{l} = 10000$ ), por ejemplo: el número de espermatozoides en 25 cuadrados es de 243. Entonces el número de espermatozoides en el 0.1 µl = 243 de espermatozoides en 1 ml = 2430000 ( $243 \times 10000$ ), entonces usted debe de tener en cuenta el factor de dilución desde la muestra original que se diluyo 1 en 100, por lo tanto  $2430,000 \times 100$  (factor de dilución) = 243, 000,000 = 243 x 106/ml (Julie, 2011).



**Figura. 33** Cuadrantes de un hemocitómetro. a) cuadrícula grande de 5 x 5 en un hemocitómetro y (b) vista de primer plano de uno de los 25 cuadrados que muestran la frontera de tres líneas a cada 4 x 4 cuadrados (Tomada de Julie, 2011).

### 3.1.2 Motilidad

La motilidad de los espermatozoides se considera esencial en las pruebas de evaluación y es probable la variable más citada en una evaluación de espermatozoides, esto es porque en el momento actual la motilidad del espermatozoide es la única característica dentro de la evaluación básica que puede dar un indicativo de la fertilidad potencial de un semental (Julie, 2011).

Estudio realizado sobre la comparación de las características del espermatozoide convencional con la fertilidad y dio como resultado que el porcentaje de motilidad progresiva es mayor a 70% y que correspondía a la fertilidad (Jasko *et al.*, 1992).

La motilidad es también el principal factor determinante sé si un individuo será aceptable para la cría con espermatozoides refrigerados o congelados, se recomienda una motilidad progresiva del 30% en un deshilo posterior. Sin embargo, el equino puede tener una excelente motilidad y seguir siendo subfértiles por lo que es importante de recordar que la motilidad de los espermatozoides representa un solo atributo de su función y como prueba única no se puede predecir la fertilidad (Julie, 2011).

### **3.1.2.1 Evaluación visual**

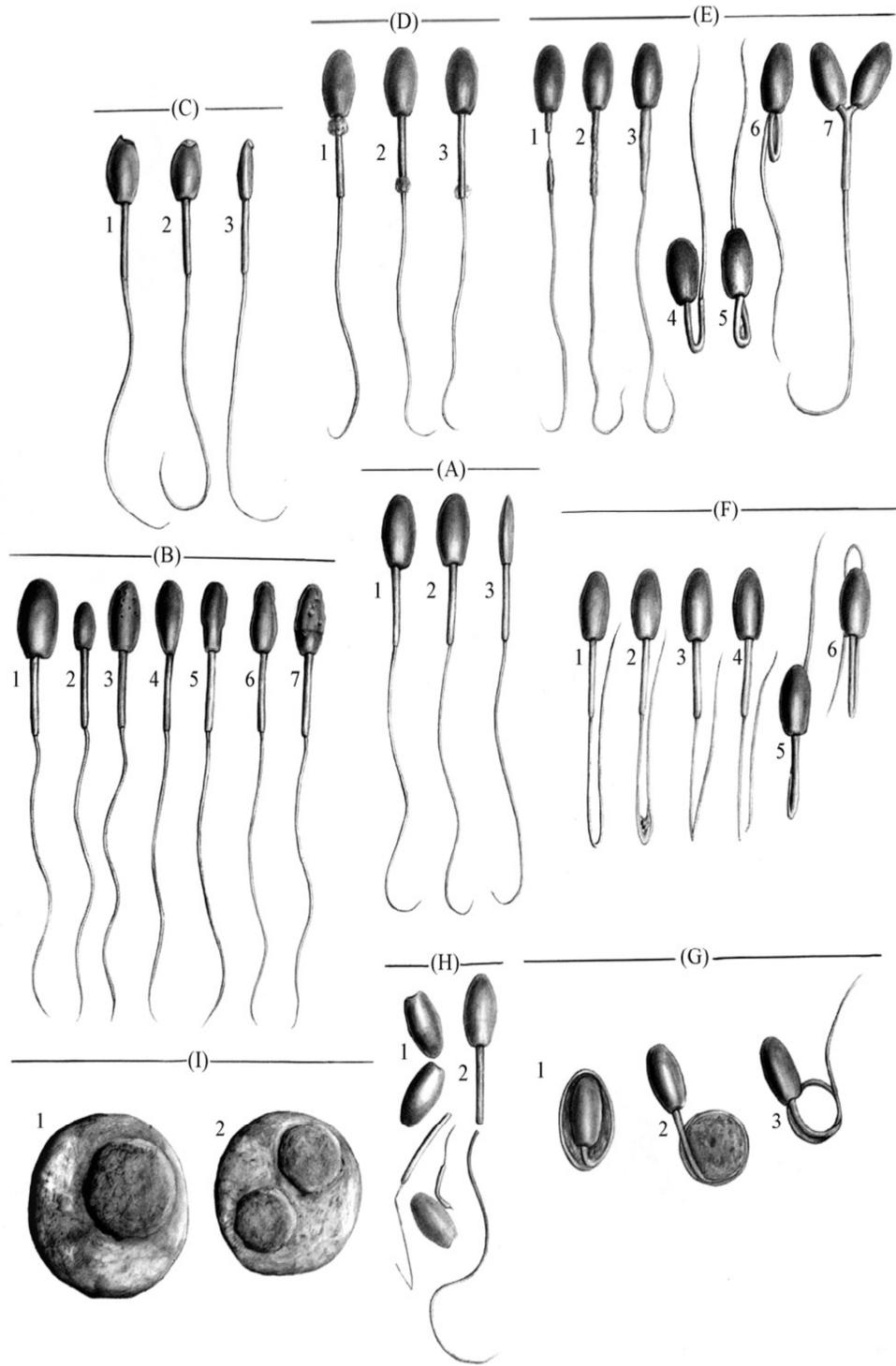
Se ha informado que la evaluación visual de la motilidad en % del espermatozoide de un total y la progresiva del % de espermatozoides que exhiben movimiento lineal rápido de la velocidad en una escala arbitraria de 0-4, son métodos simples que se pueden determinar utilizando un microscopio de fase de contraste (de 20x a 40x). Siendo el más común de análisis de la motilidad realizadas. Sin embargo, se trata de un método subjetivo de análisis en los resultado, por lo tanto son susceptibles al sesgo y pueden variar en gran medida entre los observadores. La muestra de espermatozoides debe ser evaluado después de haber sido extendido, con un extender que no tenga una tendencia de aglutinarse y altas concentraciones de espermatozoides que puede evitar la visualización de las trayectorias de espermatozoides individuales, la movilidad debe ser evaluada a 37°C por lo que el microscopio, porta objetos, cubre objetos y el equipo también deben tener una etapa de calefacción antes de su uso. Los campos múltiples a través de al menos dos deberán ser examinados en la porción central, ya que la motilidad se reduce en los bordes donde la muestra se seca o se acumulan células debido al frotis. La motilidad del espermatozoide es particularmente susceptible a las condiciones ambientales por lo tanto es críticamente importante no influir negativamente en la motilidad por la contaminación con desinfectantes, jabones o lubricantes, además evitar la excesiva exposición al calor, frío, pH, condiciones híper o hipo osmóticas, porta objetos y cubreobjetos (Julie, 2011).

### 3.1.3 Morfología

La morfología o estructura de los espermatozoides se evalúan con un microscopio óptico eléctrico de 100 X de aumento, utilizando un frotis de muestra de espermatozoides secado al aire siempre utilizando tinciones apropiadas para la preparación de la laminilla. Tinciones específicas para espermatozoides se fueron desarrolladas por, (Williams, 1950) y (Casarett, 1953).

El propósito general es generar teñir las células germinales y células somáticas en los frotis de espermatozoides, por ejemplo para teñir de fondo se utiliza tinciones de eosina-nigrosina y tinta china, son probablemente las más utilizadas ampliamente debido a su facilidad de aplicación, (Kenney, 1983).

Al menos 100 espermatozoides deben ser evaluados para determinar las anormalidades morfológicas, el tipo y frecuencia de cada defeco se debe registrar. Anormalidades en la morfología de los espermatozoides tradicionalmente se han clasificado como primarias, secundarias o terciarias. Las anormalidades primarias se considera asociada a un defecto en la espermatogénesis y por lo tanto son de origen testicular, las anomalías secundarias se crean en el sistema de los conductos y terciarias a diferencia de los dos tipos anteriores es desarrollado in vitro como el resultado de la colección de espermatozoides indebida o mala manipulación de la misma. La tendencia actual consiste en registra el número de defectos morfológicos específicos, tales como microcefalia, macrocefalia, cabezas sueltas, gotas citoplasmáticas, proximales, mediales, distales y colas enroscadas. Este método se clasificación se considera superior a los sistemas tradicionales ya que revela la información más específica sobre una población de espermatozoides, evitando al mismo tiempo suposiciones erróneas sobre el origen de estos defectos. El origen de algunos defectos morfológicos de espermatozoides es desconocido, además algunas anomalías como las cabezas sueltas puede ser primaria, secundaria o terciaria en la naturaleza, introduciendo de este modo la posibilidad de error cuando se utiliza el sistema exclusivo de clasificación tradicional (Varner, 2008). Véase figura 34.



**Figura. 34** Espermatozoides que se parecen a las imágenes morfológicas normales y anormales de espermatozoides equinos. (A) morfología de espermatozoides normales, vistos dorso ventral (A1, A2) y lateral (A3). Flagelo

abaxial de (A1) se considera normal. (B) variaciones en la morfología anormal de la cabeza incluyendo macrocefalia (B1), microcefalia (B2), vacuolas nucleares (B3), cabeza cónica (B4), cabeza piriforme (B5), cabeza de reloj de arena (B6) y degeneración de cabeza (B7). Defectos de Acrosoma (C), vistos dorso ventral (C1, C2) y lateral (C3), este defecto se denomina “nudo acrosomal”. Gotas citoplasmáticas (D), proximal (D1) y distal (D2, D3). Anomalías de porción intermedia (E), aplasia segmentaria de la vaina mitocondrial (E1), maltrato de la porción intermedia de la distribución desigual de las mitocondrias (E2), agrandamiento de la vaina mitocondrial (E3), porción intermedia doblada (E4, E5, E6), y doble pieza intermedia / cabeza doble (E7). Cola doblada (F), que incluye la región media de la porción principal (F1-F4), o con una curva singular (F5), o curva proximal (F6), que implica la unión porción intermedia-principal. Cola enrollada (G), cola rodeando la cabeza (G1), o cola no rodeando la cabeza (G2, G3). Espermatozoide fragmentado (H), cabeza suelta (H1), o fragmentación a nivel del anillo (H2). Células germinales (I), con un único núcleo (I1) o de múltiples núcleos (I2) (Tomada de Varner, 2008).

El porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales se correlaciona positivamente con la motilidad, por otra parte la evaluación cercana de la morfología proporciona información adicional sobre características individuales, esta información es importante porque el semen puede tener espermatozoides con motilidad buena pero con una incidencia relativamente elevada de anormalidades, todavía mostrando una fertilidad normal (Varner, 2000).

Algunos defectos morfológicos, por ejemplo gotas citoplasmáticas, colas dobladas parecen tener un menor efecto sobre la fertilidad de sementales criados por monta natural, mientras otros defectos, cabezas sueltas de forma anormal, macrocefalia, microcefalia, colas enrolladas y células germinales, tienen efecto perjudicial sobre la fertilidad (Love *et al.*, 2000).

En general los espermatozoides morfológicamente anormales no ejercen una influencia negativa directa sobre espermatozoides normales, por lo tanto el número total de espermatozoides morfológicamente normales en eyaculados pueden proporcionar más información acerca de la fertilidad de un semental que el porcentaje o número absoluto de espermatozoides morfológicamente anormales. El porcentaje de gametos morfológicamente normales en una muestra de semen es similar al porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides. Si es baja la motilidad de los espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normal es alta, se sugiere que los errores de laboratorio se produjeron en la disminución de la motilidad de espermatozoides, sin embargo no se puede descartar un efecto potencialmente negativo del plasma seminal sobre las características de los espermatozoides en movimiento (Varner, 2008).

## CAPÍTULO IV

---

### Obtención de espermatozoides de epidídimo

La necesidad de nuevas tecnológicas en la obtención de espermatozoides y la preservación de los mismo, ha dado lugar a un aumento de procedimientos que antes no estaban disponibles como la obtención de espermatozoides de sementales orquiectómizados o recientemente fallecidos (Jasón y Bruemmer, 2011).

La obtención de espermatozoides de epidídimo también se ha realizado en otras especies como son: cabras (*Capra aegagrus hircus*) (Blash, 2002), ciervo (*Cervus elaphus*) (Zomborsky, 1999), perro (*Canis familiaris*) (Mark, 1994; Hewitt, 2001), humanos (Sharma, 1997), antílope eland común (*Taurotragus oryx*) (Bissett, 2005), búfalo africano (*Syncerus caffer*) (Bezuidenhout, 1995; Friedmann, 2000), cebra burchell (*Equus burchellii*), rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) (Lubbe, 2000), antílope ruano (*Hippotragus equines*), gacela órice (*Oryx gazella*) (Kilian, 2000), esto nos indica que trabaja en varias especies para conservar la descendencia en varios centros reproductivos en el mundo.

Ademas un estudio reciente demostró que el número de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo es mayor que el recuperado de la vagina artificial en una sola colección (Murada's *et al.*, 2006).

#### 4.1 Viabilidad de los espermatozoides de epidídimo

Se ha demostrado que los espermatozoides obtenidos de epidídimo diluidos en un extender, tienen motilidad progresiva de 90% que se asemeja a la de los espermatozoides obtenidos por vagina artificial, aunque después de la congelación, la fertilidad es mucho menor en comparación con el espermatozoide de eyaculación (Tiplady *et al.*, 2002).

De las dos colas de epidídimo de un equino normal descansado sexualmente, adulto se ha obtenido una media de 4,642.25 millones de espermatozoides (James *et al.*, 2002) o aproximadamente el 61% que hay en el conducto del epidídimo (McKiinnon y Voss, 1993; James *et al.*, 2002).

Estudios actualizados han obtenido de la cola del epidídimo hasta una concentración de 12.960 millones/ml, con una motilidad del 15% y con una viabilidad de 11.644 millones /ml (Guedes *et al.*, 2013).

Se han realizado estudios para determinar si los espermatozoides de epidídimo pueden ser utilizados para producir embriones y si tienen la capacidad de tener descendencia (Iwamatsu y Chang, 1971). Se han obtenido resultados en la tasa de gestaciones del 66% (Papa *et al.*, 2008), existe un reporte sobre el nacimiento de un équido producido por IA utilizando espermatozoides de epidídimo congelados (Meintjes *et al.*, 1997).

## **4.2 Técnicas**

Existen tres técnicas de recuperación de espermatozoides de epidídimo utilizadas en equinos que se han descrito, estudios realizados han demostrado que la obtención de espermatozoides por epidídimo después de haber realizado la orquiectomía bilateral (Monteiro *et al.*, 2011), cualquiera de las tres pudiéndose transportar a 30°C si el laboratorio no excede los 10 minutos (Merkies y Buhr 1997) o a 4°C ya que se podrán contaminar en traslados al laboratorio de procesamiento que pueden ser hasta las 96 horas (James *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 2008; Wani, 2009; Monteiro *et al.*, 2011).

### **4.2.1 Flotación**

Este método se ha utilizado para obtener espermatozoides de epidídimo en equinos y varias especies, obteniendo el epidídimo de animales pos-mortem, pudiéndose trasladar a 4°C hasta 96 horas pos-mortem (James *et al.*, 2002).

Para lograr esto ambos testículos y epidídimos deben ser eliminados mediante procedimiento de orquiectomía cerrada, es imperativo que el epidídimo como la mayoría de conductos deferentes se deba mantener intactos (McKiinnon y Voss, 1993).

Este método se realiza, utilizando la cola del epidídimo y conductos deferente proximal, realizándose de 12-15 cortes (Sharma *et al.*, 1997; Hewitt *et al.*, 2001), suspendidos en aproximadamente 15ml de diluyente y centrifugarse a 700 gravedades durante 6 min en un tubo de centrifugación para crear un pellet de espermatozoides (James *et al.*, 2002).

Esta técnica no es muy recomendable ya que contiene varias células que dañan a nuestra muestra y nos impide evaluar satisfactoriamente a los espermatozoides para determinar la viabilidad de los mismos (Sharma *et al.*, 1997; Hewitt *et al.*, 2001).

#### **4.2.2 Lavado retrogrado**

Lavado retrogrado de la cola del epidídimo en el cual se aplica presión la cual es generada mediante una jeringa conectada al conducto deferente, los espermatozoides se transportan retrógradamente por la extensión del epidídimo, de tal manera expulsándolos a través de un corte en la unión de la cola y el cuerpo del epidídimo, recuperándolos en un vaso precipitado (Garde *et al.*, 1994).

Los espermatozoides que se encuentran almacenados en la cola del epidídimo se encuentran maduros para poder ser eyaculado y se da una mayor recuperación en el número de células espermáticas que con la obtención de espermatozoides utilizando una vagina artificial (Jones, 1998; Monteiro *et al.*, 2011).

La motilidad total y progresiva fueron mayores en espermatozoides de eyaculado en comparación con los espermatozoides de epidídimo recientemente recuperados. Al integrarle más diluyente los parámetros de la motilidad de espermatozoides de epidídimo mejoraron considerablemente (Monteiro *et al.*, 2011). Después de este procedimiento la motilidad de los espermatozoides de epidídimo fue similar a la de un eyaculado por vagina (Tiplady *et al.*, 2002; Muradas *et al.*, 2006).

Estudios realizados en la comparación de las técnicas de lavado retrogrado con la de flotación para la recuperación de espermatozoides de epidídimo obteniendo un número mayor de espermatozoides mediante lavado retrogrado. Además la muestra obtenida por esta técnica no presentan otros tipos de células, también es más rápida y eficaz por lo cual se considera una importante ventaja en esta técnica (Garde *et al.*, 1994; Martínez-Pastor *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 2011).

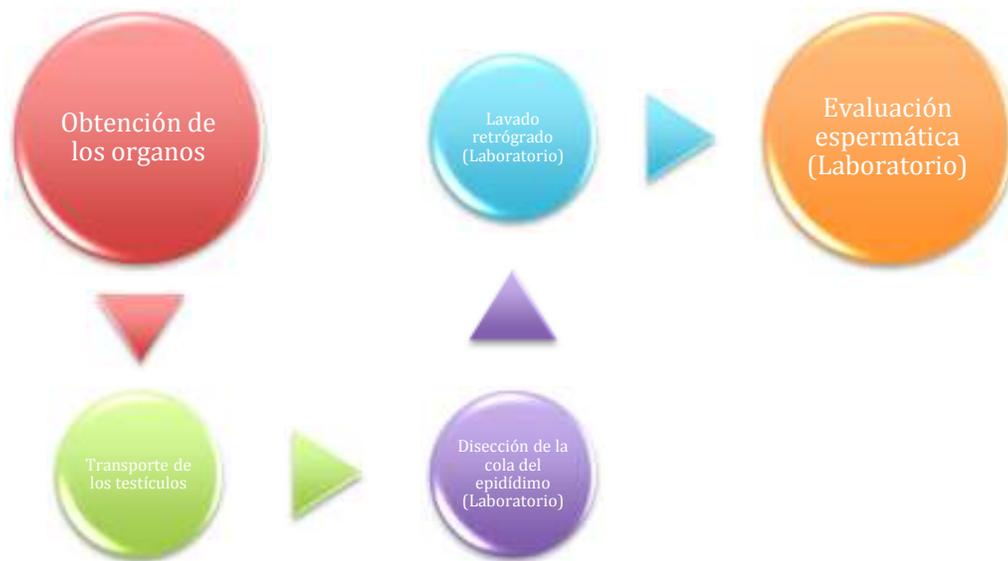
Resultados de la fertilidad muestran que la tasa de concepción de espermatozoides del epidídimo con esta técnica fueron mayores que los reportados en otros estudios, utilizándolos en fresco (Morris *et al.*, 2002).

#### **4.2.3 Lavado retrogrado modificado**

Esta técnica se trabaja con la porción disecada del conducto deferente y epidídimo, el lavado retrógrado es básicamente aplicar presión mediante una jeringa administrando diluyente, desde el conducto deferente hacia la cola del epidídimo. La técnica que se utiliza, es una modificación reportada por Granemann, en el 2006, en la que se retira la fascia epididimal para colocar linealmente al epidídimo y facilitar el paso del diluyente (Granemann, en el 2006).

Esta técnica permitió la recuperación de un mayor número de espermatozoides en comparación con una sola colección con vagina artificial y sobre todo se cuenta con menos contaminantes de células (Granemann, 2006).

#### 4.2.3.1 Procedimientos de la técnica



##### 4.2.3.1.1 Obtención de órganos

La obtención de los órganos (testículos, epidídimo y cordón espermático) se realiza mediante la técnica cerrada con el paciente en decúbito lateral (Searle *et al.*, 1999).

1. Asepsia y antisepsia. A pesar de que se tenga que trabajar con especímenes que hallan muerto, se recomienda realizar la técnica pre quirúrgica de asepsia y antisepsia, con jabón y abundante agua.
2. Se realiza un corte longitudinal en el escroto (una por testículo), a dos cm del rafe medio, de entre 8-10 cm de longitud. Se aplica presión para prolapsar el testículo cubierto por la fascia espermática, el músculo cremáster es claramente expuesto. Véase figuras 35a, b.



**Figura. 35** Orquiectomía. a) Ubicación de incisión inicial. b) Prolapso del testículo. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

3. Se retrae el tejido que rodea al cordón espermático con la ayuda de gasa.
4. Cuando el cordón espermático es expuesto por lo menos 15 cm, se coloca un cincho de plástico o ligadura y se corta. Las cinchas son de dos colores, para identificar testículo derecho (verde) de izquierdo (amarillo). Véase figura 36.



**Figura. 36** Testículo derecho, cincha verde en cordón espermático. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

5. Se realiza un lavado del testículo con solución salina al 0.9% a 34°C (la temperatura escrotal es inferior a la corporal, esto es con el fin de no provocar un choque térmico, ya que los espermatozoides en epidídimo, son menos resistentes a los cambios de temperatura).
6. Se colocan ambos testículos en una bolsa ziploc, con 15cm. de SS 0.9% a 34°C (evitando que se deshidrate).
7. Las bolsas deben estar identificadas: fecha, hora, numero de semental, nombre, edad o características de este.
8. Se determina la edad del caballo mediante la evaluación dental.

#### 4.2.3.1.2 Embalaje para el transporte

- Los testículos contenidos en las bolsas tipo ziploc permanecen a temperatura ambiente entre 15 – 20 min, esto con el fin de disminuir gradualmente la temperatura de estos. Véase figura 37a.
- Cuando ya estén atemperados, se colocan en un contenedor aislado con bolsas de gel (utilizar refrigerantes a temperatura ambiente, para colocar un cinturón alrededor del recipiente donde se colocaran las bolsas con los testículos y SS). Véase figura 36b.
- Este contenedor se coloca en una caja térmica con hielo, este debe cubrir el contenedor. Véase figura 37c.



**Figura. 37** Embalaje. a) testículos en bolsas ziploc a temperatura ambiente, b) cinturón de bolsas de gel para aislar el contenedor, c) contenedor con hielo dentro de la caja térmica. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

El transporte se realizo a 4°C siempre que el tiempo de refrigeración no exceda las 24 horas, la caja no debe ser expuesta al sol, ni abrirse hasta llegar al laboratorio (Monteiro *et al.*, 2011).

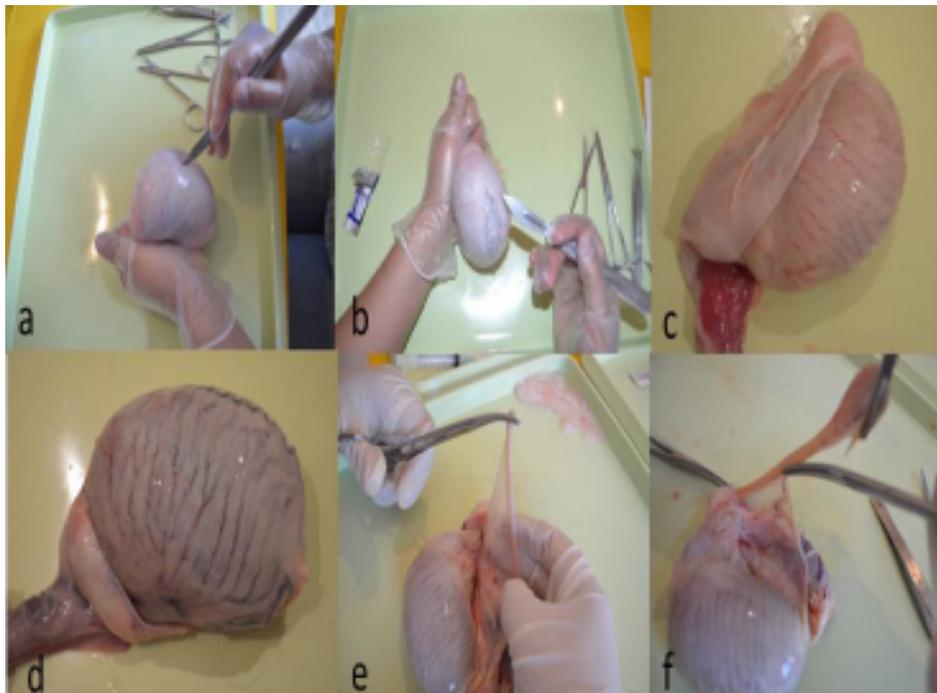
#### 4.2.3.1.3 Disección de la cola del epidídimo

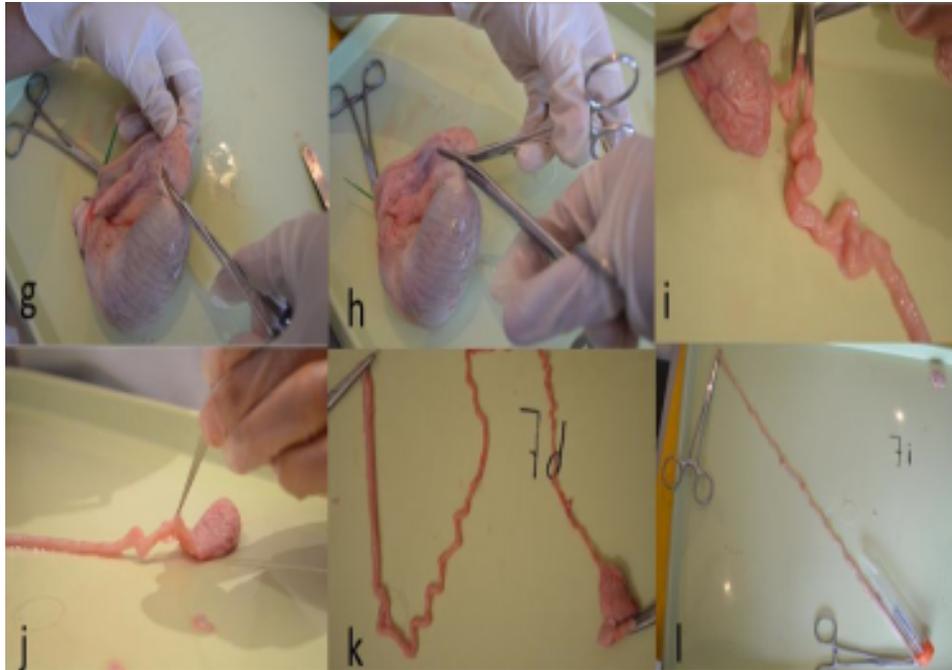
- a) Se lavan los testículos con SS a 5°C.
- b) Se realiza una incisión de 5-6 cm longitudinalmente en la fascia espermática interna y la túnica vaginal. Véase figuras 38 a, b.
- c) Se presiona para protruir el testículo.
- d) Se e vierte la túnica vaginal para exponer el epidídimo. Véase figura 36c.
- e) Se localiza la cola del epidídimo, se pinza entre el cuerpo-la cola y el extremo proximal del conducto deferente. Véase figuras 39 d, e , g.
- f) El conducto deferente se encuentra en el cordón espermático, este tiene que disecarse. Véase figura 39f.
- g) Se realiza un corte sobre el borde de la pinza del lado del cuerpo del epidídimo aislado de la cabeza, y otro en el ligamento propio del testículo . Véase figuras 38 y 39h.



**Figura. 38** Material para disección. a) Bisturí, b) Pinzas Hallsted, c) Pinzas Mcperson, d) Tijeras Iris. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

- h) El testículo y las otras dos porciones de epidídimo se desechan.
- i) Se inicia la disección de la cola del epidídimo de proximal a distal, es decir del conducto de frente hacia la cola del epidídimo. Véase figura 39i.
- j) La cola del epidídimo es un tubo dispuesto de manera sinuosa, encapsulado por la fascia epididimal, esta se va retirando con mucha precaución, los cortes que se realizan para desprender el tubo de la fascia son cortos para evitar corte o punciones no planeados (dado el caso de corte o punción la disección se detiene y se lava el tramo de epidídimo disecado, ya que a medida que avanza hacia distal, el lumen de tubo disminuye lo que dificulta la colocación del catéter. Estas punciones o cortes provocan pérdida de contenido epididimal). Véase figura 39j.
- k) A medida que la disección se aleja del ducto deferente, el conducto disminuye de calibre y aumenta la sinuosidad de su disposición, obligándonos a terminar la disección. Véase figura 39k.
- l) Al detener la disección se coloca una pinza en el extremo más distal del tubo disecado. Se realiza un corte transversal de lado distal. Véase figura 39l.





**Figura. 39** a) y b). Incisión de la túnica vaginal, c). Eversión de la túnica vaginal, d). Localización del epidídimo, e). Pinza en el extremo proximal del conducto deferente f). Disección del conducto deferente, g). Pinza entre la cola y cuerpo del epidídimo, f). Corte del ligamento propio de testículo y del cuerpo del epidídimo, i) - k), Disección del conducto del epidídimo que forma la cola, cortes cortos de la fascia epididimal, l). Porción de disecada de la cola del epidídimo y conducto deferente. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

#### 4.2.3.1.4 Lavado retrogrado

##### 4.2.3.1.4.1 Procedimientos previos al lavado epididimal

- El diluyente (MMC) y los tubos Falcon, deben estar a temperatura ambiente, para no provocar un choque térmico a los espermatozoides.
- El baño María se prepara con antelación, para que tenga la temperatura adecuada.

#### 4.2.3.1.4.2 Procedimiento

1. Se realiza un corte en el extremo proximal del conducto deferente para retirar el tejido ocluido con la pinza, esta se retira con el corte. Véase figura 39 a.
2. Se coloca el teflón del catéter en el lumen del conducto deferente (la guía del catéter no se utiliza ya que puede provocar punción en el conducto y la fuga del diluyente) y se fija con un porta agujas, se debe tener cuidado de colocarlo sobre la cubeta del catéter para no ocluir el teflón . Véase figuras 40 y 41b.

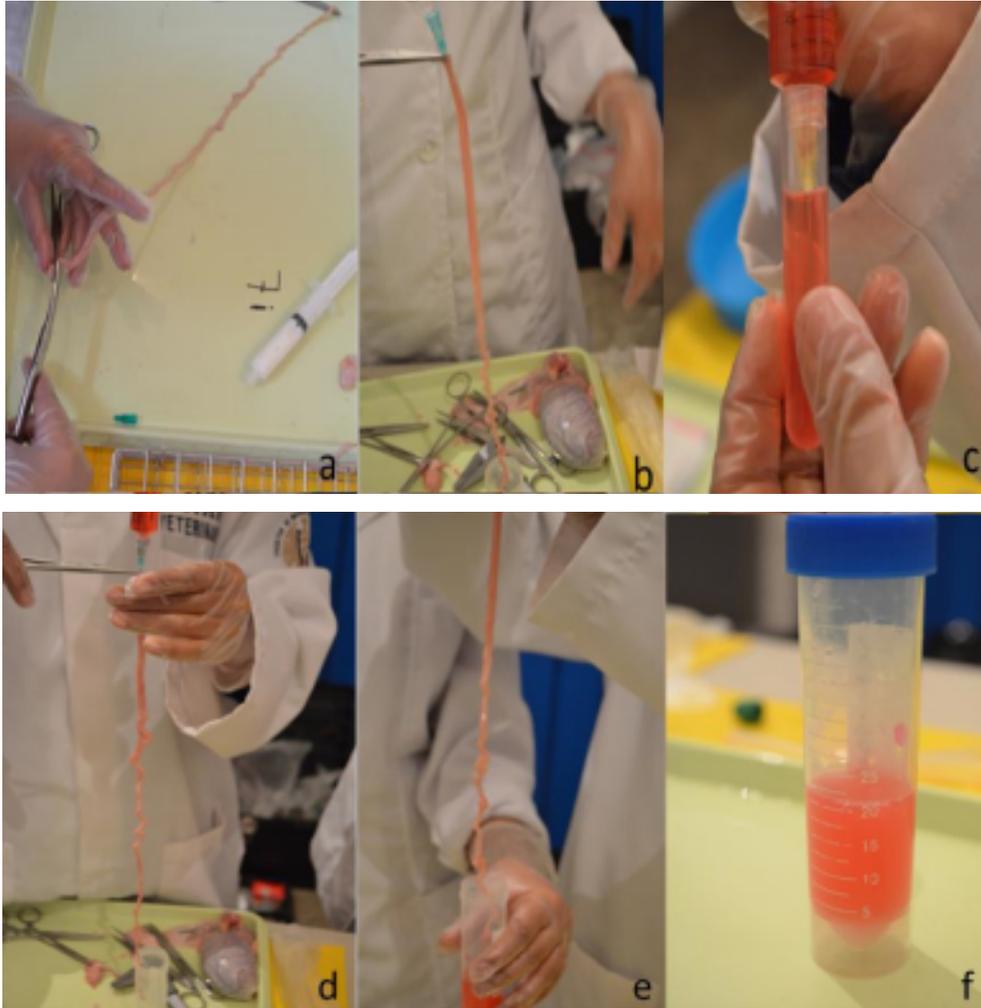


**Figura. 40** Catéter intravenoso #18. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

3. Se retira la pinza distal, y se hace un corte transversal el conducto para retirar el tejido comprimido por la pinza, y facilitar la salida del diluyente con espermatozoides. El extremo libre se coloca en tubo Falcon para que el conducto drene dentro de este.
4. El diluyente se carga en la jeringa sin látex, se conecta al catéter y se deposita. Se recomienda lavar con por lo menos 10 cm de MMC por epidídimo, ya que la concentración celular es alta. Véase figuras 41c,f y 42.
5. Después del diluyente, se depositan 5 cm de aire con la jeringa en el conducto a través de catéter, esto con el fin de promover la salida de diluyente contenido en el epidídimo.

#### 4.2.3.1.5 Incubación

- El tubo Falcon que contiene el MMC y espermatozoides, se coloca en baño María (37°C) durante 10 min.



**Figura 41.** Lavado retrógrado. a). Se realiza un corte en el extremo proximal del conducto deferente, b). Se coloca el teflón del catéter en el lumen del conducto y se fija con una pinza o porta agujas, haciendo presión sobre la cubeta no sobre el teflón, c). Se cargan >10 cm de MMC, con jeringa sin látex, d). Se pasa el MMC a través del conducto provocando la salida de los espermatozoides, estos caen en tubo Falcon (e y f). (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

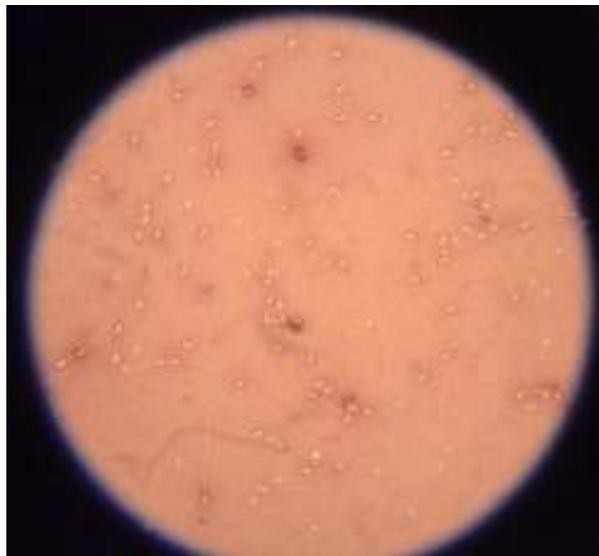
#### 4.2.3.1.6 Evaluación espermática

##### 4.2.3.1.6.1 Motilidad

- Se coloca una gota de MMC con espermatozoide en un laminilla tibia (las laminillas, cubre objetos y pipetas se mantienen a la temperatura de 37°C para evitar choque térmico al colocar los espermatozoides).
- Se observa al microscopio a 10x y posteriormente a 40x.
- Se asigna una calificación en porcentaje.

##### 4.2.3.1.6.2 Morfología y Mortalidad

1. Se coloca una gota de MMC con espermatozoides en un laminilla, se agrega una gota de tinción E-N, se homogeniza la mezcla.
2. Se realiza un frotis con la mezcla de espermatozoides y tinción.
3. Se observa al microscopio y se realiza el conteo de 100 células, tomando de nota de células muertas (teñidas de eosina) y anormales morfológicamente, obteniendo un porcentaje. Véase figura 42.
4. Se hace la diferenciación entre anomalías primarias, secundarias y terciarias.



**Figura. 42** Tinción Eosina – Nigrosina. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

#### 4.2.3.1.6.3 Concentración

1. Con la pipeta de Thoma, se toma MMC con espermatozoides hasta llegar al número 1, el resto de la pipeta (hasta llegar a 11) se llena con formalina quedando una dilución 1:10, se mezcla perfectamente.
2. Se eliminan 3 gotas y se llena la cámara de Neubauer.
3. Se deja reposar unos minutos.
4. Se observa en al microscopio a 40x.
5. Se realiza el conteo de células de los 25 cuadros, de cada cuadro mayor, considerando únicamente las cabezas que están dentro del cuadro, arriba a la derecha (la posición de las células a consideración queda al criterio del operador, pero siempre debe seguir el mismo patrón).
6. Al terminar el conteo se comparan los cuadros mayores, no debe haber diferencia de mayor del 10 % en los resultados. De ser el procedimiento se repite desde el paso 1.
7. Se promedia el resultado y se multiplica por 10000, ya que el resultado obtenido es el número de espermatozoides en 0.1  $\mu$ l.
8. El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución (1:10), es decir por 10.

#### 4.2.3.1.6.4 Espermatozoides viables

El número de espermatozoides viables se obtiene de la resta de espermatozoides con mala motilidad, muertos y anormales. Se obtiene a través de la siguiente formula:

$$\text{Viables} = \text{concentración} \times \text{motilidad} \times \text{vivos} \times \text{morfología normal.}$$

## CONCLUSIONES

---

A lo largo de la monografía se apreciaron temas principales en la reproducción del semental equino, el origen y desarrollo del esperma que posteriormente se obtendrá mediante diversas técnicas para su obtención (espermatozoides), escrutando en estas técnicas se hace especial énfasis en el *lavado retrogrado modificado*; mediante esta técnica ejecuto mi redacción a base en mis observaciones, prácticas y conclusiones. Coincidiendo con (Granemann, en el 2006; Papa *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2011),

La diferencia en cuanto cantidad de información (técnicas) lograda reside no tanto en la validez de la conclusión que se obtiene de diversos autores sino en la calidad de la observación mediante la cual se pudieron al realizar las prácticas de esta técnica llegando así a tener mayor predilección de mi parte por su eficacia y con apoyo de diversos reportes científicos garantizan efectividad en tasa de recuperación en comparación de las demás técnicas.

El ambiente de trabajo donde pasó de ser teoría a práctica empezó en campo abierto para obtener las gónadas y estas sean trasladadas al laboratorio estrictamente con la temperatura adecuada para no afectar la viabilidad de los espermatozoides teniendo un tiempo no mayor de 12 horas, posteriormente realizaba la disección al epidídimo para poderlo obtener de forma recta para así hacer el lavado retrogrado efectivamente.

Toda utilización de gametos futura no se verá afectada si se toman las medidas de seguridad e higiene, esto nos permite seguir con el linaje del equino que no se podrá colectar posteriormente; los avances tecnológicos han permitido reemplazar en estos casos la concepción natural y acudir a las técnicas de última opción para obtención de espermatozoides. Sin embargo la concentración y la motilidad de las células recuperadas varían, pero no es determinante para descartar la muestra pero si hay que determinar la morfología ya que esto si puede afectar en una utilización de este material genético lo que sería una inseminación artificial y/o gestación.

## ANEXOS

---

### Diluyente

**Tabla 2.** Medio Mínimo de Cultivo (Roge y Yanagimachi, 1975), pH 7.4 (**Figura. 40**).

Reactivo	g/ 100 ml
NaCL	0.596
NaHCO <sub>3</sub>	0.311
CaCl <sub>2</sub>	0.025
Lactato de Na	0.003
Piruvato de Na	0.220
Rojo fenol	0.002
Glucosa	0.110



**Figura. 40** Medio Mínimo de Cultivo. (Proporcionada por el Depto. de Reproducción FMVZ-UNAM. 2013).

## REFERENCIAS

---

1. Aime K. Johnson and Charles C. Love. Epididymal Abnormalities. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2011; 111: 1156-1160.
2. Almahbobi G, Papadopoulos V, Carreau S, Silberzahn P. Agerelated morphological and functional changes in the Leydig cells of the horse. *Biol. Rep.* 1988; 38:653–65.
3. Amann RP. A review of anatomy and physiology of the stallion. *J. Equi. Vet. Sci.* 1981; 1:83–106.
4. Amann RP and Ganjam VK. Effects of hemicastration or hCG: treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions. *J. Androl.* 1981; 3:132–139.
5. Amann RP and Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* 1983; 63(Suppl. 2):380–403.
6. Amann RP. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ. Health. Perspect.* 1986; 70:149–58.
7. Amann RP. Structure and function of the normal testis and epididymis. *J. Am. Coll. Toxicol.* 1989; 8 457–71.
8. Amann RP, Hamerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality. *J. Androl.* 1993; 14:397.
9. Amann RP and Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 2004;25:317–25.
10. Amman RP. Functional Anatomy of the Adult Male. En *Equine Reproduction*. 2ºEd. Editado por McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE y Varner DD. Blackwell Publishing Ltd. 2011; 867-880.
11. Banks WJ. *Applied Veterinary Histology*. Baltimore. Williams & Wilkins. 1986; 2.

12. Bardin W, Cheng C, Mustow N, Knobil E, Neill J. The Sertoli cell. *The Physiology of Reproduction. Rav. Press.* 1994; 2:1291-1333.
13. Berndtson WE, Squires EL, Thompson Jr DL. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology.* 1983; 20:449–457.
14. Berndtson WE, Igboeli G, Parker WG. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biol. Rep.* 1987; 37:60–67.
15. Bezuidenhout C, Fourie le RF, Meintjies M, Bornman MS, Bartels P, Godke RA. Comparative epididymal sperm cell motility of African ungulate and equid game species stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995; 43(1):167.
16. Bissett C, Bernard RTF: The effect of prolonged cold storage of eland (*Taurotragus oryx*) cauda epididymides on the spermatozoa: possible implications for the conservation of biodiversity. *Theriogenology.* 2005; 63: 1592–1604.
17. Blash S, Melican D, Gavin W: Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology.* 2002; 54: 899–905.
18. Bilinska B, Hejmeh A, Gancarczyk M, Sadowska J. Immunoexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1040: 227–9.
19. Bilinska B, Wiszniewska B, Kosiniak-Kamysz K, Kotula-Balak M, Gancarczyk M, Hejmej A, Sadowska J, March- lewicz M, Kolasa A, Wenda-Rozewicka L. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Rep. Biol. Suppl.* 2006; 1:43–58.
20. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J. Androl.* 2004; 25:645–656.
21. Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G, Squires EL. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology.* 2002; 58: 405–407.

22. Card C: Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology*. 2005; 64: 558.
23. Casarett GW. A one-solution stain for spermatozoa. *Stain. Tecnology*. 1953; 28:125–127.
24. Cêrveny C, König HE, Liebich HG. Organos genitais masculinos. En Anatomía de los animales domésticos, tomo II. 2° ed. Editado por König HE, Liebich HG. Médica Panamericana. 2005; 119 -134.
25. Colenbrander B, Puyk H, Zandee AR, Parlevliet J. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 1992; 88:29– 37.
26. Cooper TG. Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 377:87–101.
27. Cosentino MJ, Cockett ATK. Review Article: Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 1986; 14:229–40.
28. Courot M. The effects of gonadotropins on testicular function (spermatogenesis). In: Proc. 11th Internat. Congr. Anim. Rep. AI. 5:311–319, 1988.
29. Chenier TS. Anatomy and examination of normal testicle. En Current therapy in equine reproduction. Editado por: Samper JC, Pycock JF y McKinnon AO. Saunders Elsevier. 2007; 167-189.
30. Clay CM, Squires EL, Amann RP, Nett TM. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone follicle stimulating hormone and testosterone. *J. Anim. Sci.* 1988; 66:1246–55.
31. Clemmons AJ, Thompson DL Jr, Johnson L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol. Rep.* 1995; 52:1258–67.
32. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005; 63:992–1003.
33. Fawcett DW. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton DW, Greep RO (eds) *Handbook of Physiology*, vol. 5, section 7. Washington, DC: Amer. Phys. Soc. 1975; pp. 21–55.
34. Foster RA, Ladds PW. Male genital system. In: Maxie MG (ed.) *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 5th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007; pp. 565–619.

- 35.** Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux R, Dacheux JL. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Rep.* 2000; 62; 1790–803.
- 36.** Franca L, Avelar G, Almeida F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology.* 2005; 63:300–18.
- 37.** Friedman R, Scott M, Heath SE, Hughes JP, Daels PF, Tran TQ: The effects of increased testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. *J. Rep. and Fert. Suppl.* 1991; 44:127–134.
- 38.** Friedman Y, Lubbe K, Kilian I, Grobler DG, Denniston RS: Changes in motility and morphological characteristics of African buffalo (*Syncerus caffer*) sperm during storage of the epididymis. *Theriogenology.* 2000; 53(1):332.
- 39.** Garde J, Aguado M, Perez, S, Garrido D, Perez GM, Montoro V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology.* 1994; 41: 203.
- 40.** Guedes CD, Vianna MA, Monteiro GA, Emerim PA, Maura CP. Colheita e criopreservação de sêmen da cauda do epidídimo em equinos (*Equus caballus*). *Collection and cryopreservation of equine (Equus caballus) cauda epididymis spermatozoa. Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina.* 2013; 24: 212-215.
- 41.** Graham JK, Mocé E: Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology.* 2005; 64: 492.
- 42.** Granemann LC: Avaliação comparativa do semen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia (Comparative evaluation of stallion semen collected by artificial vagina and intraluminal epididymal flush after castration). *MSc. Thesis. UFdoP, Curitiba, 2006: 48.*
- 43.** Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. Hormones, growth factors and reproduction. In: Hafez B, Hafez ESE (eds) *Reproduction in Farm Animals*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 33–54
- 44.** Hafez ESE and Hafez B. *Reproduction in Farm Animals.* 7 Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2000; 509.

45. Heise A, Thompson PN, Gerber D. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Rep. Sci.* 2011; 123: 192-201.
46. Hejmej A, Gorazd M, Kosiniak KK, Wiszniewska B, Sadowska J, Bilinska B. Expression of aromatase and estrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualized by means of immunohistochemistry. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2005;29: 534–547.
47. Hemeida NA, Sack WO, McEntee K. Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *Am. J. Vet. Res.* 1978;39: 1892–1900.
48. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Rep. Biol. Endo.* 2003;1: 52–66.
49. Hess RA and Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim. Rep. Sci.* 2004; 1:5–30.
50. Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Rep. Sci.* 2001; 67:101–111.
51. Hochereau-de Reviers MT. Control of spermatogonial multiplication. In: McKerns KW (ed.) *Reproductive Processes and Contraception*. New York: Plenum Press. 1981; 307–31.
52. Hochereau-de Reviers MT, Monet KC, Courot M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J. Rep. Fert. Suppl.* 1987; 34:101–14.
53. Hochereau-de Reviers MT, Courtens J, Courot M, De Reviers M, Lamming GE. Spermatogenesis in mammals and birds. *Marshall's Physiology of Reproduction, Reproduction in the Male. J. Rep. Fert. Suppl* 1990; 2:106–82.
54. Iwamatsu Y and Chang MC. Factors involved in the fertilization of mouse eggs invitro. *J. Rep. Fertil.* 1971;26:197-208.
55. James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA, et al. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology.* 2002; 58: 401-404.
56. Jason E and Bruemmer. Freezing Epididymal Spermatozoa.

Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2011; 317: 2983-2986.

**57.** Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1992; 200(7):979–85.

**58.** Johnson L, Amann RP, Pickett BW. Scanning electron microscopy of the epithelium and spermatozoa in the equine excurrent duct system. *Am. J. Vet. Res.* 1978; 39:1428–34.

**59.** Johnson L and Neaves WB. Age related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol. Rep.* 1981; 24:703–712.

**60.** Johnson L and Thompson DL Jr. Age related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Rep.* 1983; 29:777-789.

**61.** Johnson L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. *Biol. Rep.* 1985; 32:1181–90.

**62.** Johnson L. A new approach to quantification of Sertoli cells that avoids problems associated with the irregular nuclear surface. *Anat. Rec.* 1986; 214:231–237.

**63.** Johnson L and Thompson DL Jr. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biol. Rep.* 1986;35:971–979.

**64.** Johnson L and Nguyen HB: Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. *J. Rep. and Fert.* 1986; 76: 311–316.

**65.** Johnson L and Tatum ME. Sequence of seasonal changes in numbers of Sertoli, Leydig and germ cells in adult stallions. In: Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988: 373.

**66.** Johnson L. Spermatogenesis (animal species and humans). In: Proceedings of the International Symposium on Gamete Physiology,

Newport Beach, CA, Serono Symposia. 1988.

**67.** Johnson L and Tatum ME. Temporal appearance of the seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells and germ cells in stallions. *Biol. Rep.* 1989; 40: 994–999.

**68.** Johnson L, Hardy VB, Martin MT. Staging equine seminiferous tubules by Nomarski optics in unstained histologic sections and in tubules mounted *in toto* to reveal the spermatogenic wave. *Anat. Rec.* 1990b; 227:167–174.

**69.** Johnson L. Spermatogenesis. In: Cupps PT (ed.) *Reproduction in Domestic Animals*, 4th edn. New York: Academic. Press. 1991<sup>a</sup>; 173–219.

**70.** Johnson L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol. Rep.* 1991b; 44: 284-291.

**71.** Johnson L. *Efficiency of Spermatogenesis in Humans and Animals*. College Station, TX: College of veterinary medicine Texas A&M University, 1997.

**72.** Johnson L. Cleet E. Griffin and Michael TM. Spermatogenesis. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. *Equine Reproduction*. Second Edition. *Blackwell Publishing Ltd.* 2011; 101:1026-1052.

**73.** Jones, R., 1998. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J. Rep. Fertil.* 53, 73–84.

**74.** Julie B and Skeife. Evaluation of Semen. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner. *Equine Reproduction*, Second Edition. Blackwell Publishing Ltd. 2011; 124: 1278-1291.

**75.** Kenney RM. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings, NE: *Society for Theriogenology*. 1983.

**76.** Kilian I, Lubbe K, Bartels P, Friedmann Y, Denniston RS. Evaluating epididymal sperm of African wildruminants: longevity when stored at 4°C and viability following cryopreservation. *Theriogenology*. 2000; 53(1):330.

**77.** Kretser DM, Kerr JB, Knobil E, Neill J. The cytology of the testis. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988; 837–932.

**78.** Levy JB, Husmann DA. The hormonal control of testicular descent,

- J. Androl.* 1995; 16(6): 459-463.
- 79.** Love CC, Varner DD, Thompson JA. Intra and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Rep. Fert. Suppl.* 2000; 56:93.
- 80.** Lubbe K, Bartels P, Kilian I, Friedmann Y, Godke RA. Comparing motility and morphology of horse, zebra and rhinoceros epididymal spermatozoa when cryopreserved with two different cryodiluents or stored at 4°C. *Theriogenology.* 2000;53(1):338.
- 81.** Magistrini M, Guitton E, Le Vern Y. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology.* 1997; 48:1229.
- 82.** McKinnon AO and Voss JL (eds). *Equine Reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- 83.** McKinnon O, editado por Edward LS, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner: *Equine Reproduction*, Edit by Angie. 2011; 2:882.
- 84.** Marks SL, Dupius J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CC. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994; 204:1639–1640.
- 85.** Martínez-Pastor F, Macias VG, Alvarez M, Chamorro C, Herraiz P, Paz P, Anel L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology.* 2006; 65, 471–485.
- 86.** Meintjes M, Bezuidenhout C, Bartels P, Visser DS, Meintjes J, Loskutoff NM, Fourie F le, Barry DM, Godke RA. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's Zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 1997; 28:251-259.
- 87.** Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA Jr, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Ani. Rep. Sci.* 2011; 204: 197–20.
- 88.** Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology.* 2002; 58: 643–646.

- 89.** Muradas PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoídes equínos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo (Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing. *Arch. Vet. Sci.* 2006; 11: 69–74.
- 90.** Naden J, Amann RP, Squires EL. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *J. Rep. Fertil.* 1990; 88:167–176.
- 91.** Nie R, Zhou Q, Jassim E, Saunders PT, Hess RA. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biol. Rep.* 2002; 66:1161–8.
- 92.** Olson GE, Sammons DW. Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biol. Rep.* 1980; 22:319–32.
- 93.** Papa FO, Melo CM, Fioratti, Dell'Aqua Jr, Zahn FS, Alvarenga, MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Ani. Rep. Sci.* 2008; 107:293–301.
- 94.** Parlevliet JM, Bidstrup LA, Famula T, Roser JF. Transferrin concentrations in the different regions of the epididymis and in the testes in horses of different ages. In: Proceedings 15th ICAR, 2004. 160.
- 95.** Parlevliet JM, Pearl CA, Hess MF, Famula TR, Roser JF. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology.* 2006; 66:755–756.
- 96.** Parlevliet JM, Bidstrup LA, Roser JF. Transferrin concentrations in seminal fluid in horses: a marker for fertility. *Anim. Rep. Sci.* 2008; 107:337–338.
- 97.** Parvinen M, Hecht NB. Identification of living spermatogenic cells of the mouse by transillumination-phase contrast microscopic technique for *in situ* analyses of DNA polymerase activities. *Histochemistry* 1981; 71:567–79.
- 98.** Pearl CA and Roser JF. Lactoferrin in the stallion epididymis: localization and steroid regulation. In: Proceedings of the 39th Annual SSR Meeting, 2006.153.

- 99.** Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *J. Ani. Rep.* 2007; 134:3.
- 100.** Pickett BW, Amann RP, McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. *Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency*, II. Colorado State University Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 05, 1989.
- 101.** Reyes-Moreno C, Laflamme J, Frenette G, Sirard MA, Sullivan R. Spermatozoa modulate epididymal cell proliferation and protein secretion in vitro. *Mol. Rep. Dev.* 2008; 75:512–20.
- 102.** Robaire B and Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Rep.* 1995; 52:226–36.
- 103.** Roberts SJ. Infertility in male animal's andrology, *veterinary obstetrics and genital diseases. Theriogenology.* 1986 ;3:752–893.
- 104.** Samper JC. Diseases of the male system, *the horse, diseases and clinical management. Saun Phil* 1995; 2: 937–972.
- 105.** Searle D, Dart AJ, Dart CM, Hodgson DR. Equine castration: review of anatomy, approaches, techniques, and complications in anormal, criptorchid an monorchid horse, *Aust. Vet. J.* 1999; 77:428-434.
- 106.** Setchell BP, Brooks DE, Knobil E, Neill J. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction.* 1988; 753–836.
- 107.** Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. Anatomy; vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. Editado por: Knobil E, Neill ID. *The Physiology of Reproduction*, 2nd Ed. New York: Raven Press. 1994:1063-1175.
- 108.** Sisson S. Male genitalia. In: Sisson S, Grossman JD (eds) *The Anatomy of the Domestic Animal*, vol. 1, 5th ed. Toronto: W.B. Saunders Co., 1975; 531–541.
- 109.** Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. The roles of the epididymis and proteasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Rep. Sci.* 2008; 107:237–48.
- 110.** Sharma RK, Padron OF, Thomas AJ, Agarwal A. Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *J. Fert. Ster.* 1997; 68:

626–631.

**111.** Tiplady CA, Morris LHA, Allen WR. Stallion epididymal spermatozoa, pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*. 2002; 58: 225–228.

**112.** Thompson DL and Evans J. Reproductive physiology of stallions and jacks, *horse breeding and management*. Elsevier. 1992; 237–261.

**113.** Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. Diseases of the epididymis. In Pratt P (ed.) *Diseases and Management of Breeding Stallions*. Goleta, CA: Ame. Vet. Pub. 1991<sup>a</sup>: 233–240.

**114.** Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. Reproductive anatomy and physiology. In Pratt PW (ed.) *Diseases and Management of Breeding Stallions*. Goleta, CA: Ame. Vet. Pub. 1991<sup>b</sup>; 1–59.

**115.** Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, et al. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Anim. Rep. Sci.* 2000; 60-61: 493.

**116.** Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. 2008; 70: 448–462.

**117.** Wani NA. In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 °C. *Anim. Rep. Sci.* 2009; 111: 69–79

**118.** Williams WW. Cytology of the human spermatozoon. *Fertil Steril* 1950; 1:199–215.

**119.** Yamashita S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. *Anat. Rec.* 2004; 279:768–78.

**120.** Zomborsky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta. Vet. Hung.* 1999; 47:263–270.

**121.** Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl.* 2002;23:870–81.