



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



Estudios sobre la congelación del semen de burro criollo (*Equus asinus*)

Tesis que para obtener el título de:

**Maestra en Ciencias en Desarrollo Tecnológico en Sistemas de
Producción Animal.**

Orientación Profesionalizante

Presenta:

Irma Arcelia Toscano Torres

Asesor:

Dr. J. Jesús Conejo Nava

Comité Tutorial:

Dra. Rosa Elvira Núñez Anita

Dr. Daniel Val Arreola

Dr. Marcos Cajero Juárez

Tarímbaro, Michoacán, diciembre 2015

DEDICATORIA

A mi mamá

Irma Torres Torres

Por su apoyo incondicional, por enseñarme valores, por forjar mi carácter y por sacrificarse siempre para que yo saliera adelante. El Fruto de todos sus esfuerzos es mi carrera y ser quien soy.

GRACIAS INFINITAS

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por ser una institución generosa que me ha brindado la oportunidad de crecer profesionalmente.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme los conocimientos necesarios para completar mi formación profesional y permitirme ser parte de su gremio.

A la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal y al Centro de Estudios Multidisciplinarios en Biotecnología por abrirme las puertas de sus instalaciones y facilitarme las condiciones necesarias para llevar a cabo mi trabajo de investigación.

A Marcos Cajero Juárez, que ha sido, además de un querido amigo, un asesor en muchos aspectos de mi vida profesional, por brindarme su apoyo y aportarme sus conocimientos intelectuales, sus vivencias y ser un ejemplo de superación y profesionalismo.

A Rosa Elvira Núñez Anita, por ser mi asesora, mi amiga, mi compañera de trabajo y estar siempre ahí. Gracias Elvis por todo tu apoyo y tus consejos.

A Ingrid Brenda Olivo Zepeda por compartir conmigo toda su generosidad y buena vibra. Gracias por ser mi amiga siempre y nunca dejarme sola, por todo su trabajo y esfuerzo reflejado en el mío.

Al Dr. Manuel Jaime Tena Martínez por demostrarme su apoyo y motivarme en el trabajo, gracias por compartir sus consejos y sobre todo por brindarme su amistad.

Al Dr. Daniel Val Arreola le agradezco su asesoría y su amistad, además del apoyo brindado durante el curso de la maestría.

Al Dr. Jesús Conejo Nava quien me motivó e impulsó a sacar mi trabajo de investigación adelante, le agradezco todo el apoyo, sus consejos y su asesoría.

A mis estudiantes Juanita, por ser una excelente alumna y aprender junto conmigo; Jesús, por apoyarme en conseguir burritos, prestarme las instalaciones de su rancho donde realicé gran parte de mi trabajo y echarme la mano; a Ramón, José Arturo, Juan Manuel, gracias por su ayuda.

A Roselia Corona Flores por sus siempre atinados buenos consejos y por compartirme de sus conocimientos en los procesos de fertilización in vitro. Además de ser una buena amiga.

A mis hermanos, en especial a Edgar, Ricardo y Hortensia, por compartir conmigo gran parte de mi vida, por apoyarme siempre y ser mis mejores amigos.

A mi papá Hermenegildo Toscano Ramos, por todo su amor, comprensión y cariño.

A mis amigos y amigas, Ornella, Jatziri, Leslie, Edmundo, Eloisa, Venancio, gracias por ser los mejores, por estar siempre conmigo y brindarme su ayuda y apoyo incondicional.

A mi familia, gracias por conservarse unidos y apoyarme siempre, son un ejemplo de vida.

A Héctor Merlos Chávez por su apoyo en los momentos difíciles, por su amor incondicional y por compartir su vida conmigo. Gracias también a su familia por hacerme sentir parte de ellos y demostrarme su cariño.

A todas aquellas personas que colaboraron de una u otra forma para que se llevara a cabo este trabajo de investigación.

Este trabajo fue desarrollado en la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Agradezco al Rancho “La Carreta” del Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo, y al MVZ Luis Jesús Ávila del Municipio de Lagunillas, Michoacán por las facilidades otorgadas para la obtención de muestras de semen de burros criollos. Agradecemos el financiamiento parcial otorgado por la Coordinación de la Investigación Científica a través del convenio CIC-UMSNH 2012-2014.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.	2
2.	ANTECEDENTES	4
2.1.	Origen del burro doméstico.	4
2.2.	Los primeros burros en América.	5
2.3.	Características generales del burro.	5
2.4.	Situación del burro criollo en México.	6
2.5.	Conservación de semen.	7
2.6.	Aspectos relacionados con la congelación del semen de burro.	13
2.6.1.	Centrifugación del semen.	13
2.6.2.	Refrigeración del semen	16
2.7.	Daño del proceso de criopreservación sobre el espermatozoide equino.	17
2.8.	Pruebas de unión a ovocito y de fertilización <i>in vitro</i> heteróloga del espermatozoide equino.	18
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
4.	HIPÓTESIS.	20
5.	OBJETIVO GENERAL.	21
6.	OBJETIVOS PARTICULARES.	21
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.	21
7.1.	Localización.	21
7.2.	Animales.	22
7.3.	Diseño experimental.	22
7.4.	Obtención y evaluación del semen.	24
7.5.	Criopreservación de semen.	25
7.5.1.	Dilución del semen.	25
7.5.2.	Centrifugación del semen.	26
7.5.3.	Refrigeración del semen diluido.	26
7.5.4.	Congelación del semen.	26
7.5.5.	Descongelación del semen.	26

7.6. Determinación del estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de burro mediante clortetraciclina (CTC) fluorescente.	27
7.7. Evaluación de la capacidad de unión del espermatozoide de burro a ovocitos de cerda.	28
7.7.1. Obtención y manipulación de los ovocitos.	28
7.7.2. Preparación de los espermatozoides.	28
7.7.3. Ensayo de unión de espermatozoides de burro en ovocitos de cerda.	29
7.8. Análisis estadístico.	29
8. RESULTADOS.	30
8.1. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con y sin plasma seminal en la movilidad progresiva y viabilidad espermática, postdilución y postdescongelación.	30
8.2. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con y sin plasma seminal en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, postdilución y postdescongelación.	31
8.3. Ensayo de unión espermatozoide-ovocito de cerda <i>in vitro</i> .	33
9. DISCUSIÓN.	35
10. CONCLUSIONES.	38
11. BIBLIOGRAFÍA.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Componentes de los diluyentes del semen.	8
Cuadro 2. Diluyentes utilizados en la conservación de semen de burro y evaluación de fertilidad en yeguas y burras	12
Cuadro 3. Motilidad total (MT) y Viabilidad (V) del semen de burro, centrifugado y no centrifugado, a diferentes fuerzas y tiempo de centrifugado, temperatura (Temp) y tiempo de refrigeración (Tiempo refrig).	16
Cuadro 4. Características de los eyaculados colectados en tres burros criollos.	25
Cuadro 5. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) o sin plasma seminal (SPS) en la movilidad progresiva y viabilidad espermática del semen diluido (n=15).	30
Cuadro 6. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) o sin plasma seminal (SPS) en la movilidad progresiva y viabilidad espermática en el semen congelado (n=15).	31
Cuadro 7. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) y sin plasma seminal (SPS) en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide del semen diluido (n=15).	32
Cuadro 8. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) y sin plasma seminal (SPS) en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide congelado de burro criollo (n=15).	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento empleado en el experimento 1.	23
Figura 2. Ensayos de unión espermatozoide-ovocito heterólogo.	24
Figura 3. Ensayo de unión <i>in vitro</i> de espermatozoides de burro a ovocitos de cerda.	34
Figura 4. Unión de espermatozoides descongelados de burro a ovocitos de cerda con el diluyente EquiPro.	35
Figura 5. Unión de espermatozoides descongelados de burro a ovocitos de cerda con el diluyente Triladyl.	35

RESUMEN

En México, ha habido un descenso significativo de la población asnal en los últimos años. Sin embargo, hay pocos estudios sobre esta especie. El objetivo fue evaluar dos diluyentes comerciales (Triladyl vs EquiPro) en la congelación del semen de burro criollo (*Equus asinus*) (con y sin plasma seminal) mediante la determinación de la movilidad y viabilidad espermáticas, la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y la capacidad de unión a ovocitos de cerda. Se obtuvieron 15 eyaculados provenientes de 3 burros criollos en etapa reproductiva mediante vagina artificial. La fracción espermática se evaluó macro y microscópicamente. Cada eyaculado se dividió y congeló en los diluyentes con plasma seminal (CPS) y sin plasma seminal (SPS). Se determinaron los porcentajes de movilidad progresiva (MP) viabilidad (V) y estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide (capacitados (CA) no capacitados (NC) y con reacción acrosomal (RA)) mediante clortetraciclina en dos momentos: postdilución (PD) y postdescongelación (PC). Se determinó el número de espermatozoides unidos/ovocito. Se utilizó un ANOVA de bloques multivariados (calidad espermática y estado funcional de la membrana plasmática) y de una vía con prueba *pos hoc* de Tukey (capacidad de unión). Resultados, Equipro: MP/PC 35.7 ± 10.7 y 31.3 ± 9.2 ; V/PC 67.7 ± 9.1 y 65.0 ± 11.6 SPS y CPS respectivamente. Triladyl: MP/PC 40.3 ± 9.9 y 37.3 ± 8.0 ; V/PC 66.6 ± 10.6 y 66.5 ± 8.9 SPS y CPS respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre diluyentes, ni CPS y SPS. Los porcentajes de CA, NC y RA fueron similares entre tratamientos. Número de espermatozoides unidos/ovocito: Equipro, SPS 5.2 y CPS 1.2. Triladyl, SPS 4.83 y CPS 2.98. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre diluyentes, CPS y SPS. Conclusión: El Triladyl y Equipro son efectivos para la congelación de semen de burro criollo. El Triladyl mejoró la capacidad de unión de los espermatozoides en presencia del plasma seminal.

Palabras clave: congelación, diluyente, espermatozoides, ensayo de unión, plasma seminal.

ABSTRACT

In Mexico, there has been a significant decline in population asinine in recent years. However, undirected research reported about this species. In this paper were evaluated Triladyl and Equipro extenders for donkey semen freezing; the effect of seminal plasma on sperm quality was analyzed during the freezing process and the fertilizing capacity was determined by the binding assay using oocytes sow. We obtained 15 ejaculates from 3 creole donkey's reproductive stage by artificial vagina method. The sperm fraction was evaluated macroscopically and microscopically. Each ejaculate was divided and frozen in the above extenders with or without removal of seminal plasma (removal of seminal plasma (RSP) and presence of seminal plasma (PSP), respectively). The percentages of progressive motility (PM) viability (V) and functional status of the sperm plasma membrane (trained (T) untrained (UT) and acrosome reaction (AR)) by chlortetracycline in two stages: post-dilution (PD) and post-thawing (PT) were determined. The number of sperm bound/oocyte were determined. An ANOVA multivariate blocks (sperm quality and functional status of the sperm plasma membrane) and analysis one way variance with pos hoc Tukey test (binding capacity) was performed. Results, Equipro: PM/PT 35.7 ± 10.7 and 31.3 ± 9.2 ; V/PT 67.7 ± 9.1 and 65.0 ± 11.6 RSP and PSP respectively. Triladyl: PM/PT 40.3 ± 9.9 and 37.3 ± 8.0 ; V/PT 66.6 ± 10.6 and 66.5 ± 8.9 RSP and PSP respectively. Non significative values were obtained ($P > 0.05$) compared Equipro vs Triladyl, neither RSP nor PSP. T, UT and AR no changed. Number of sperm bound/oocyte: Equipro, RSP 5.2 and PSP 1.2. Triladyl, RSP 4.83 and PSP 2.98. There were significative values ($p < 0.05$) between extensors, both RSP and PSP. Conclusion: Triladyl and Equipro are effective for freezing creole donkey semen. Triladyl improved the binding capacity of donkey sperm to oocytes sow in the presence of seminal plasma.

1. INTRODUCCIÓN.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), ha registrado un total de 7616 razas de ganado en el mundo, de las cuales 690 están clasificadas como extintas y 1491 se clasifican como razas en peligro de extinción. Para el caso de la especie asnal, la FAO (2010) menciona que existe un total de 156 razas de burros, de las cuales 140 son locales (razas que se registran en un sólo país), 10 transfronterizas regionales (razas que se registran tan solo en una de las siete regiones del mundo: África; Asia; Europa y el Cáucaso; América Latina y el Caribe; Cercano y Medio Oriente; América del Norte; y Pacífico Sudoccidental), y 6 transfronterizas internacionales (razas que se registran en más de una región). Además, 6 razas se han extinguido para siempre. Del total de estas razas, 95 se desconoce su estado de peligro, 10 están en situación crítica, 14 se encuentran clasificadas en peligro de extinción y solamente 34 razas no corren ningún peligro. Se cree que debido a la estigmatización que sufre el asno, aún existen muchas razas sin registrar.

Starkey and Starkey (2000) estimaron que a nivel mundial hubo un crecimiento del inventario asnal de 37 a 44 millones de cabezas, entre 1961 y 1996, especialmente en África, Asia y el Cercano y Medio Oriente. Sin embargo, en 2006 la población mundial descendió a 41 millones de cabezas (Kugler *et al.*, 2008). En Europa Occidental esta disminución del inventario asnal ha sido más drástica, de 1 millón 552 mil cabezas en 1966 a 426 mil cabezas en 1996. No obstante el asno es utilizado como medio de transporte por las personas pobres y en regiones que carecen de infraestructuras de transporte bien desarrollada (FAO, 2010).

En Europa el descenso de la población asnal ha provocado que un gran número de razas se hallen en peligro de extinción (Kugler *et al.*, 2008). En España existen 6 razas locales, Andaluza, de las Encartaciones, Catalana, Mejorera, Mallorquina y Zamorano-Leonesa, de las cuales, las cinco primeras se encuentran en situación crítica (con $\leq$ de 100 hembras y $\leq$ de 5 machos) (Taberner, 2010). En Italia, la raza Martina Franca estuvo en peligro de extinción en los ochentas (Rizzi *et al.*, 2011) y

en Sudáfrica hay un descenso de la población asnal a partir de 1950 y no se ha recuperado (Starkey, 1995b). Por ello, en varios países se han implementado programas de conservación de las razas asnales locales, tales como España (Jordana y Folch, 1998) Brasil (Canisso y McDonell, 2010) e Italia (Cecchi *et al.*, 2006), entre otros.

En México, también se ha observado un descenso dramático de la población asnal en las últimas cuatro décadas. En 1970 había 3.2 millones de cabezas (SIC. Dirección General de Estadística, 1975), mientras que en 1991 la población asnal descendió a 1.5 millones (INEGI, 1994) y en 2007 se registraron 581 mil cabezas (INEGI, 2007), lo que implica que en este periodo disminuyó el inventario nacional de burros en 80% aproximadamente. Se considera que uno de los principales motivos de este descenso es la implementación y extensión de la maquinaria agrícola y el desarrollo de los modernos medios de transporte (Villegas *et al.*, 2001). De seguir descendiendo el inventario nacional a la misma velocidad, el burro en México estaría en peligro de desaparecer a mediano plazo.

Del poco más de medio millón de cabezas de burros la mayoría de los animales son burros criollos, que proceden de la cruce indiscriminada de las razas de asnos españolas introducidas a la Nueva España durante la conquista. López-Alonso y de Aluja (2005) comprobaron que las poblaciones de burro Criollo mexicano derivan en primer lugar de la raza Andaluza, seguido de la razas Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias.

Durante más de 500 años los asnos fueron criados por la población indígena y campesina de nuestro país, con alimentos de bajo valor nutritivo y baratos, lo que propició el desarrollo de individuos de talla pequeña (Aluja *et al.*, 2005), pero adaptados a las diversas regiones ecológicas y a las condiciones de la población pobre de México. Dicha especie mantiene en la actualidad importancia económica en las zonas rurales del centro y sur de nuestro país, ya que se utiliza como medio de transporte, como animales de tiro y como animales para el deporte y la recreación (Arriaga *et al.*, 2003).

Los programas de conservación del asno incluyen la reproducción natural *in situ*, la inseminación artificial para la procreación de más individuos y la conservación del germoplasma que incluye la criopreservación de tejidos y semen.

El uso del semen congelado, es una herramienta biotecnológica que se ha empleado principalmente para la conservación de las razas nativas de burros, sin embargo se han realizado pocos estudios en todo el mundo y no se han estandarizado protocolos de congelación para esta especie (Oliveira *et al.*, 2006). En España, Brasil y Francia, se han adaptado protocolos basados en los procedimientos empleados para la criopreservación del semen de caballos con resultados de movilidad espermática que alcanzan un máximo de 40%, más aún, en el momento de evaluar la fertilidad han mostrado que este porcentaje se reduce (Canisso *et al.*, 2008b).

El propósito de este trabajo fue establecer las condiciones óptimas para la congelación del semen de burro criollo de México. Para lograr tal propósito se plantearon dos etapas: Etapa 1) Establecer un protocolo en el que se pueda discernir entre dos diluyentes comerciales, uno para equinos y otro para bovinos, además de determinar si la presencia de plasma seminal influye en la movilidad y viabilidad del espermatozoide. Etapa 2) Determinar la fertilidad del espermatozoide congelado, empleando dos parámetros *in vitro*, el primero para evaluar el estado funcional de la membrana plasmática y el segundo, para evaluar la capacidad de unión espermatozoide-ovocito.

2. ANTECEDENTES

2.1. Origen del burro doméstico.

Darwin propuso la teoría del origen del burro a partir de un único tronco común africano, del que luego se derivarían todas las razas asnales actuales (Aranguren, 2002). Sin embargo, recientemente los estudios de ADN permitieron determinar el origen del burro doméstico mediante un análisis filogenético, a partir de los datos de 259 burros domésticos de 52 países, y se describió que su origen fue en el noreste de África hace aproximadamente 5,000 años, y que provienen de dos linajes

diferentes del noreste africano: el Asno salvaje de Nubia, (*Equus africanus.africanus*) y el Asno salvaje de Somalia (*Equus africanus somaliensis*) (Beja-Pereira *et al.*, 2004; Pierce, 2010).

El noreste africano posee la mayor diversidad de burros, deduciendo que éste es la única especie ganadera ungulada domesticada exclusivamente en África (Pierce, 2010). Los análisis filogenéticos demuestran que los burros han sido movilizados e intensamente comercializados alrededor del mundo. Este dato evidencia la contribución de la región del noreste africano en las migraciones humanas y el comercio hacia Europa y Asia (Pierce, 2010; Beja-Pereira *et al.*, 2004).

2.2. Los primeros burros en América.

Cristóbal Colón fue quien en 1495 introdujo en América los primeros burros, cuatro machos y dos hembras. En 1521, la demanda de equinos creció considerablemente y para los años treinta del siglo XVI, se reiteraba la exigencia del envío de pies de cría de esta especie proveniente de Europa a México. El obispo Ramírez de Fuenleal, Presidente de la segunda Audiencia en la Nueva España entre 1531 y 1536, escribía a la Metrópoli diciendo: "Convendría mucho que viniesen trescientas borricas para distribuir las entre los indios. Hago que se les den ovejas y criarlas con grande amor". De ese modo es como empezó a establecerse en la América continental la cría del ganado asnal y mular, que tanto impulso recibió durante la Colonia, y aún después, para el trabajo en las minas, la agricultura y el abastecimiento de víveres a ciudades y pueblos (Medina, 2010).

2.3. Características generales del burro.

El burro tiene varias cualidades o ventajas con respecto a otras especies domésticas, entre las que destacan: la gran adaptabilidad de esta especie tanto local como regionalmente; genera ingresos extras al ser rentada por su propietario a los vecinos de su localidad; y es considerado un animal de trabajo. Además, la alimentación del burro es barata con respecto a los caballos ya que se mantiene con los alimentos disponibles de la región y no necesita una dieta especial; los

burros son animales aptos para realizar trabajos de carga (hasta 50 kg) y agrícolas. El temperamento del burro es tranquilo y puede convivir fácilmente con otros animales de granja; es una especie longeva que puede vivir entre 30 y 40 años, es muy resistente a enfermedades y se adapta fácilmente al medio ambiente (Starkey, 1995a). Estas características hacen del burro un animal que representa un apoyo importante para las comunidades pobres y marginadas en todo el mundo.

2.4. Situación del burro criollo en México.

El Informe sobre la Situación de los Recursos Genéticos Pecuarios de México, menciona que en 1970 más del 62% de la superficie cultivada en México se realizaba con tracción animal, utilizando principalmente equinos, que representaban el 58% de las unidades de producción. Actualmente, existen poblaciones de ganado criollo identificadas que tienen un papel socioeconómico y ecológico muy importante para diferentes regiones y que se asocian a poblaciones rurales de bajos recursos económicos. El burro criollo es explotado en un sistema de producción familiar a pequeña escala, ubicado principalmente en regiones de trópico seco y templado, y es utilizado como un animal de trabajo, como una ayuda indispensable al campesino marginado, que vive en regiones remotas y mal comunicadas. Sin embargo, poco se ha hecho para mejorarlos (SAGARPA, 2002).

La información sobre el burro criollo en México es escasa. La Universidad Autónoma de México a través de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, inició en los años 90, estudios en burros criollos, sobre el peso y la edad en que empiezan a trabajar, los años productivos, el peso de las cargas, el tiempo que las transportan. Sin embargo, no se tienen datos concretos con respecto a su reproducción (SAGARPA, 2002). Considerando la disminución de la población de burros en México y su importancia en las actividades pecuarias, resulta necesario implementar procedimientos tendientes a la conservación de esta especie.

2.5. Conservación de semen.

El primer trabajo sobre congelación de semen de burros fue realizado por Polge y Minotakis en 1964, con un diluyente a base de yema de huevo y glicerol, envasando el semen refrigerado en ampollitas de vidrio, siguiendo la metodología de congelación del semen de bovino. Posteriormente, Krause y Grove (1967) evaluaron diluyentes a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, obteniendo motilidades después del congelamiento de 50-70%, con resultados de fertilidad muy variables que van del 25 al 39% (Canisso *et al.*, 2008b).

Los diluyentes utilizados para la conservación de semen de burro derivan de los empleados en caballos y se basan principalmente en el empleo de la leche o sus subproductos, aunque existen diferencias entre los espermatozoides de ambas especies, particularmente en la composición lipídica de la membrana plasmática (Álvarez *et al.*, 2006).

La composición química de los diluyentes es muy variable, pero generalmente contienen una fuente de energía, ingredientes tampón, crioprotector y antibióticos (cuadro 1).

En la década de los 70's se comenzó a usar la leche fresca descremada para conservar el semen en estado refrigerado, previamente calentada a una temperatura de 92 a 95°C durante 10 minutos para inactivar la lactenina, la cual es tóxica para los espermatozoides equinos. En Francia, la leche ultra pasteurizada fue usada ampliamente en la conservación de semen de caballo por 8 horas a 5° C, con buenos resultados (Betellier *et al.*, 2001). Actualmente, la leche descremada y ultrapasteurizada se puede conseguir fácilmente en el mercado, lista para usarse, obteniendo el 76.5% de fertilidad en yeguas inseminadas con semen de burro refrigerado (Boeta y Zarco, 2000). Dos limitantes de este ingrediente es la vida media muy corta del semen diluido y la inespecificidad de sus componentes.

Cuadro 1. Componentes de los diluyentes del semen (Velasco, 2005; Brinsko y Vanner, 1992; Salisbury *et al.*, 1978).

Componente	Función
Tris (Hidroximetil-aminometano)	Tampón biológico, mantiene constante el pH de una solución (pH 7.0-pH 8.0).
Azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa, etc.)	Aportan la energía necesaria para que el espermatozoide desarrolle sus procesos metabólicos, habiéndose verificado que los espermatozoides únicamente pueden glicosilar la glucosa, fructosa y manosa; mientras que por vía oxidativa emplean también arabinosa. Además. di- y trisacáridos actúan como sustancias crioprotectoras al recubrir la membrana plasmática, contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico y disminuir los efectos lesivos de la concentración de solutos.
Citrato de sodio	Amortiguador de pH y mantiene la presión osmótica. Aumenta la vitalidad de los espermatozoides.
EDTA (Ácido etileno diamino tetra acético)	Agente quelante de iones metálicos como Ca^{++} y Mg^{++} . Inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al DNA.
Yema de huevo	Las lipoproteínas presentes recubren la superficie de la célula espermática a modo de cubierta reversible durante la congelación y descongelación por una unión lábil que se realiza entre los lípidos de la yema y las lipoproteínas de la membrana plasmática, bloqueando así la entrada de iones de calcio a la célula.
Aminoácidos (glutamina)	Estabilizan las membranas celulares y mantienen la respiración en la mitocondria.
Leche descremada	Medio extensor del semen rico en proteínas como la fosfocaseína y la β -lactoglobulina.
Lactosa	Azúcar de la leche que mantiene el metabolismo de los espermatozoides.
Glicerol, Etilenglicol, Dimetilacetamida (DMA), Dimetilformamida (DMF)	Agentes crioprotectores.
Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina, Penicilina, Tircacilina	Agentes antimicrobianos.

Kenney puso su nombre a un diluyente a base de leche de vaca descremada en polvo y glucosa y ha sido usado ampliamente en la conservación de semen de caballo a 5°C (Pineda y Pinilla, 2007). El INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, siglas en francés) desarrolló un diluyente comercial que contiene leche de vaca descremada ultrapasteurizada en polvo, glucosa y citrato, para conservar el semen de caballo a 4°-8°C (en estado líquido), bajo condiciones anaeróbicas, al que se le denominó INRA 82 (Batellier *et al.*, 2001). Desde 1985, la leche Ultrapasteurizada semi-desnatada, suplementada con penicilina y gentamicina se utiliza en Francia para la inseminación artificial en yeguas de manera inmediata o con semen almacenado 8 horas a 4°C (Batellier, 1997).

Sin embargo, la leche de vaca tiene una estructura química compleja, ya que posee más de 100,000 moléculas y su composición varía de acuerdo con la dieta y etapa de lactancia (Batellier, 1997). Consecuentemente, la investigación se orientó a identificar los componentes lácteos que pudieran ejercer funciones protectoras del espermatozoide equino durante la refrigeración, encontrándose que el fosfocaseinato y la β -lactoglobulina cumplen tales funciones, aunque no son sinérgicos en su acción protectora (Batellier *et al.*, 2001). Estos autores desarrollaron un nuevo diluyente, el INRA96®, (IMV, L'Aigle, Cédex, Francia) conteniendo fosfocaseinato de calcio y ha sido empleado en la conservación de semen de garañón, bajo refrigeración y congelación, produciendo una tasa de preñez del 71% en yeguas (Pillet *et al.*, 2008). El nombre comercial de este diluyente es INRA freeze (IMV Technologies, Francia).

Otro diluyente comercial a base de caseinato y proteínas del suero lácteo es el EquiPro ® (Minitube, Alemania) empleado para la conservación del semen de caballos, ya sea refrigerado o congelado (Qeusada *et al.*, 2012; Pagl *et al.*, 2006).

El Ez-Freezin "LE" ® (ARS, Chino, California, USA), es un diluyente comercial que contiene EDTA, lactosa y el antibiótico ticarcilina; específico para ser usado en la criopreservación del semen equino. Antes de su congelación el semen se diluye en el EZ-Mixing ® (ARS, Chino, California, USA), para su centrifugación. Trabajos

recientes informan haber encontrado movilidades espermáticas de 26%-50% y viabilidades post-descongelación del 74% (Ávila, 2009; Orozco *et al.*, 2011).

Además, en el mercado existe un diluyente para la congelación de semen bovino a base de Tris-citrato de sodio y yema de huevo; contiene amortiguadores de pH; diversos azúcares (fructosa, sucrosa, glucosa) como fuente de energía; y componentes que mantienen el equilibrio osmótico; antibióticos como la penicilina y la gentamicina y glicerol como crioprotector. Este diluyente de nombre Triladyl (Minitube de México), ha comprobado su eficacia en la congelación de semen de diferentes especies como caninos (Aldana 2011), ovinos (Toscano 2006), bovinos (Janett *et al.*, 2005), aves (Ochoa 2010) y ungulados silvestres (Santiago y López 2010). Además, el Triladyl ha sido probado en nuestro laboratorio recientemente en la congelación de semen de caballo, con un protocolo de 900 rpm durante 5 minutos, mostrando buenos resultados *in vitro* (41.1% de movilidad y 60.4% de viabilidad) (González, 2013).

En México el Triladyl tiene una ventaja económica en la criopreservación del semen equino, considerando que su precio es de \$755.35, lo cual hace posible congelar hasta 41.7 eyaculados de 30 ml aproximadamente, obteniendo un costo total por eyaculado congelado de \$18.13 (González, 2013). Esto lo hace más barato en comparación con otros diluyentes como el EZ-Freezin Le®, cuyo costo es de \$1,500 por eyaculado congelado, o el EquiPro, cuyo costo ascienden a \$43.5 por eyaculado congelado. Sin embargo, el Triladyl no se ha probado en la criopreservación del semen de burro.

La diferencia entre los componentes de ambos diluyentes permitirá establecer si el semen de burro puede almacenarse exitosamente y mantener los parámetros de calidad seminal y capacidad de fertilización.

Los estudios sobre la congelación de semen de burro son pocos a saber: Rota *et al.*, (2012) realizaron estudios de criopreservación de semen de burros de raza Amiata, utilizando el INRA 82 para equinos, suplementado con yema de huevo y etilenglicol como crioprotector, además adicionaron plasma seminal homólogo como medio

extensor para la criopreservación del semen de burro. El crioprotector más comúnmente usado para la congelación de espermatozoides equinos es el glicerol, sin embargo, en el caso de la especie asnal, este crioprotector afecta considerablemente la fertilidad en las hembras inseminadas, por lo que se recomienda realizar un lavado del semen post-descongelado para retirarlo.

Canisso, *et al.*, (2011), determinaron la fertilidad del semen criopreservado de burros de la raza Pega utilizando diluyentes a base de EDTA-lactosa y Lactosa-yema de huevo con buenos resultados de fertilidad en yeguas al día 15 post-ovulación.

Trimeche *et al.*, (1998), congelaron semen de burros Poitou utilizando un medio base (glucosa, lactosa, rafinosa, citrato de sodio, citrato de potasio y glicerol) suplementado con 80mM L-glutamina y 10% yema de huevo de codorniz con el objeto de evaluar el efecto crioprotector de ambos componentes. Demostraron que la glutamina en conjunto con la yema de huevo de codorniz mejoraron los porcentajes de motilidad de los espermatozoides postdescongelamiento, sugiriendo que la yema de huevo de codorniz es más eficaz que la de pollo ya que contiene menos ácidos grasos poliinsaturados y más fosfatidilcolina que ayuda a la resistencia de la membrana plasmática del espermatozoide al choque frío. Además determinaron que la eficiencia del semen post-descongelado en IA depende de la remoción del glicerol o mejora con una dilución (v/v) en un medio base sin glicerol antes de la IA, esto con el objetivo de reducir la presión osmótica del medio.

En el cuadro 2 se muestran los resultados de movilidad y fertilidad alcanzados con los diversos procedimientos empleados en la conservación de semen de burro con diferentes tipos de diluyentes. Los resultados muestran una mayor movilidad en el semen refrigerado, del 70 al 85%, en comparación con el semen congelado-descongelado, del 37 al 63%. Igualmente existe un mayor porcentaje de fertilidad en burras inseminadas con semen refrigerado (63%), con respecto al semen congelado, (23.1% a 38.9%). Las bajas tasas de fertilidad y la variabilidad de los resultados indica la necesidad de estandarizar y mejorar los protocolos para la congelación del semen de burro.

Cuadro 2. Diluyentes utilizados en la conservación de semen de burro y evaluación de fertilidad en yeguas* y burras**

Diluyente	Método de conservación	% Movilidad total	% de Fertilidad	Autores
Baken modificado- 10% de yema de huevo	5°C	80	sin datos	Cottorello <i>et al.</i> , 2002
Baken modificado- 3% de yema de huevo	5°C	75	sin datos	
Kenney	5°C		54.5 [¥]	Boeta y Zarco, 2000
Leche descremada	5°C		76.5 [¥]	
INRA 82 (2% yema de huevo centrifugada)	5°C	70-85	63 ^{¥¥}	Rota <i>et al.</i> , 2008
INRA 96 (Dimetilformamida, DMF)	Criopreservado	57.48	sin datos	Pineda <i>et al.</i> , 2007
INRA glicerol-yema de huevo	Criopreservado	51.2	23.1 ^{¥¥} 30.4 [¥]	Rota <i>et al.</i> , 2012
INRA Etilenglicol-yema de huevo	Criopreservado	53.3	25 ^{¥¥} 53.8 [¥]	
Lactosa-EDTA	Criopreservado	37	53.33 [¥]	Canisso <i>et al.</i> , 2011
Lactosa-yema de huevo	Criopreservado	37	50 [¥]	
T2-94 (80 mML-glutamina-10% yema de huevo de codorniz)	Criopreservado	53.4	38.9 ^{¥¥}	Trimeche <i>et al.</i> , 1998
Gent®-Etilenglicol	Criopreservado	63.76	sin datos	Qeusada <i>et al.</i> , 2012

La ausencia de un protocolo satisfactorio que evite el daño de los espermatozoides de burro ante el proceso de congelación, representa un área de oportunidad para el estudio de diluyentes empleados en la conservación de semen.

Además, se ha determinado que los factores fisiológicos del tracto reproductivo de la hembra receptora, juegan un papel preponderante en la fertilización. Tal es el caso

de la respuesta uterina de las burras frente a la inseminación artificial (IA) con semen congelado, ya que disminuye significativamente la fertilidad en comparación con el semen refrigerado; este fenómeno se ha atribuido en parte al uso de ciertos crioprotectores que favorecen la respuesta inflamatoria, al exceso de células espermáticas, a la presencia de bacterias, a los componentes del plasma seminal y a otros componentes del diluyente que aún no se han determinado (Rota *et al.*, 2012).

En síntesis, existe muy poca información sobre la congelación del semen de burro, por lo que gran parte de los procedimientos derivan de los protocolos empleados en garañones, lo que indica la necesidad de investigar la validez de estos protocolos o la utilidad de los diluyentes desarrollados en caballos o en bovinos. De los diluyentes descritos anteriormente, la literatura indica que los mejores son aquellos cuya composición incluye a las proteínas lácteas. Pero es necesario investigar su utilidad en la conservación del semen de burro. Asimismo, es conveniente, insistir en la valoración del Triladyl, que difiere de los diluyentes con componentes lácteos, pero cuyo interés radica en el bajo precio en el mercado mexicano y los resultados positivos obtenidos en la congelación del semen de varias especies domésticas, en trabajos realizados en nuestro laboratorio.

2.6. Aspectos relacionados con la congelación del semen de burro.

2.6.1. Centrifugación del semen.

Nishikawa (1959) demostró que la movilidad del semen equino, sin diluir, cae inmediatamente después de la recolección. Por el contrario, el intercambio de plasma seminal (PS) del garañón y toro semental o verraco, conduce a una disminución de la movilidad de los espermatozoides del toro o verraco y prolonga la movilidad del semen equino. Por tanto, es necesario diluir el esperma inmediatamente después de la recolección en un medio o "diluyente" apropiado (Batellier, 1997).

Estudios más recientes confirman efecto perjudicial del PS sobre el almacenamiento del espermatozoide equino, ya sea refrigerado o criopreservado. Cuando la proporción PS se reduce a aproximadamente $\leq 5\%$, los espermatozoides son capaces de mantener una motilidad más deseable en comparación con las muestras que contienen un mayor proporción de PS (10-30%). La motilidad del espermatozoide y la integridad del ADN también son superiores en muestras sin PS en comparación con muestras con un mayor contenido de PS (Kareskoski y Katila, 2008).

Por lo anterior, la extracción del plasma seminal por centrifugación, es otro procedimiento utilizado para disminuir el efecto negativo del PS en los protocolos de congelación del semen equino. Sin embargo, la remoción del PS durante la criopreservación favorece el estrés oxidativo del semen equino, dada su gran capacidad antioxidante. Además, el PS equino posee actividades de superóxido-dismutasa (SOD) y de glutatión-peroxidasa (GPX), y otras moléculas presentes como las vitaminas C y E, urato, albúmina, taurina, hipotaurina, piruvato y lactato, que podrían actuar como antioxidantes (Pizarro *et al.*, 2013). Otro estudio en equinos realizado por Pizarro *et al.*, (2013), sugieren que la adición del plasma seminal al 10% (v/v) y al 20% en la solución de congelación, permitió controlar los procesos de peroxidación lipídica en los espermatozoides equinos criopreservados. Este efecto podría atribuirse a la presencia de moléculas antioxidantes presentes en el plasma seminal.

Por el contrario, Raphael, (2007) indica que la presencia del plasma seminal en el semen de caballos puede inducir la peroxidación lipídica de las membranas espermáticas durante la criopreservación, por lo que recomienda su remoción empleando centrifugación leve (400 a 600 g) por 15 minutos.

En el caso de la especie asnal, existen pocos trabajos sobre la conveniencia de centrifugar o no el semen para separar el plasma seminal. Además, los resultados que se muestran en el cuadro 3, son controversiales. Los resultados de Miro *et al.*,

(2009) sugieren centrifugar el semen de burro Catalán, independientemente del tiempo de refrigeración (24, 48 y 72h), mantenido a 5°C. Igualmente Serres *et al.*, (2002) recomiendan la centrifugación del semen de burro de la raza Zamorano-Leones. Por el contrario, Taberner *et al.*, (2010) en el burro Catalán y Rota *et al.*, (2008) en el burro Amiata sugieren que la centrifugación no ofrece ventajas sobre la no centrifugación.

Entre los diluyentes empleados para la centrifugación del semen se encuentran: solución sacarosa al 11% (Piao *et al.*, 1988), solución glucosa EDTA (Martim *et al.*, 1979; Klug, 1992), solución de lactato ringer enriquecido con medio Kenney, (Serres *et al.*, 2002; Canisso, 2008), los medios INRA 82 e INRA 96, y leche descremada ultrapasteurizada (Vidament, 2005; Vidament *et al.*, 2005, 2008). El Kenney parece ser el diluyente más utilizado para la centrifugación del semen de burro con buenos resultados.

En síntesis la literatura muestra que la separación del plasma seminal es una práctica recomendada para la conservación del semen de garañón, pero su utilización en protocolos de congelación del semen de burro es discutible (cuadro 3).

Cuadro 3. Motilidad total (MT) y Viabilidad (V) del semen de burro, centrifugado y no centrifugado, a diferentes velocidad y tiempo de centrifugación, de temperatura (Temp) y de tiempo de refrigeración (Tiempo refrig).

Diluyente	Centrifugado		velocidad y tiempo de centrifugado	No centrifugado		Temp (°C)	Tiempo refrig. (h)	Autores
	MT (%)	V (%)		MT (%)	V (%)			
Kenney	sin datos	72.40	660g/15 min.	sin datos	62.65	5	24	Miró <i>et al.</i> , (2009)
	sin datos	66.30		sin datos	48.52	5	48	
	sin datos	42.10		sin datos	<25	5	72	
Kenney	78.0	65.2	600g/15 min.	86.4	71.9	5	2	Taberner <i>et al.</i> , (2010)
	82.1	63.1		88.0	68.0	15	2	
	82.6	69.0		92.6	73.3	20	2	
INRA 82	60 80	sin datos	400g/7 min.	50 20	sin datos	15	12 48	Serres <i>et al.</i> , (2002)
INRA 82-Y	90 80	sin datos	700g/10 min.	90 80	sin datos	5	24 72	Rota <i>et al.</i> , 2008

2.6.2. Refrigeración del semen.

Los tiempos de refrigeración o período de equilibrio previo a la criopreservación, pueden ir de 2-72 horas (cuadro 3). Qeusada, *et al.*, (2012), encontraron diferencias significativas entre 0 y 24 horas post enfriamiento a 5°C.

La congelación directa de los espermatozoides de burro en nitrógeno líquido a -196°C con un mínimo o sin tiempo de equilibrio es mejor en términos de movilidad espermática que previamente equilibrado durante más tiempo. Los tiempos de refrigeración para la criopreservación del semen de burro, que muestran los mejores parámetros de movilidad espermáticas, se obtienen cuando el semen se refrigera a 5°C durante 1 hora (cuadro 3).

2.7. Daño del proceso de criopreservación sobre el espermatozoide equino.

El espermatozoide es una célula cuya función principal es el transporte del material cromosómico paterno para depositarlo en el ovocito durante la fecundación. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con estructuras especializadas tales como la membrana plasmática que muestra varios dominios, el acrosoma, los orgánulos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial y el flagelo. Estas estructuras garantizan la interacción del gameto con el tracto genital femenino y con el ovocito.

La criopreservación, cuyo propósito es garantizar la sobrevivencia del espermatozoide a largo plazo, desestabiliza la estructura de la membrana plasmática, altera su permeabilidad al calcio y provoca un incremento letal a nivel intracelular (Parks y Lynch, 1992). El daño ultraestructural y bioquímico que ocurre en muchos espermatozoides durante la congelación y descongelación está causado por: 1) La formación intracelular de cristales de hielo afectan la estructura del espermatozoide; 2) La concentración del soluto se produce conforme el agua pura se quita del medio de suspensión del interior y del exterior de las células; y 3) Las interacciones de esos dos factores físicos (Salisbury *et al.*, 1978). Sin embargo, un número pequeño de espermatozoides permanecen móviles y probablemente funcionalmente intactos, los cuales pueden participar en la fertilización (Maxwell y Watson, 1996).

La viabilidad y movilidad del espermatozoide se mantienen durante más tiempo que su capacidad fertilizante. Esto se debe a que los cambios de las membranas del espermatozoide durante el almacenamiento, eventualmente, hacen a las células incapaces para la fertilización ya que se aceleran los procesos de capacitación y se acorta el período de vida fértil de la célula (Maxwell y Watson, 1996).

Los cambios en la membrana plasmática de espermatozoides sometidos a congelación-descongelación pueden ser visualizados con el uso de la clortetraciclina (CTC) bajo un microscopio de fluorescencia para monitorear el desplazamiento de Ca^{++} en el interior de la membrana plasmática en la cabeza espermática (Neild *et al.*, 2003; Chenoweth, 2000). La CTC ofrece la ventaja de

distinguir tres etapas de activación de los espermatozoides: capacitados con acrosoma intacto, no capacitados y capacitados con acrosoma reaccionado (Rathi *et al.*, 2001). Esta metodología puede ser útil para evaluar cambios de la membrana plasmática en el espermatozoide de burro por la congelación-descongelación.

2.8. Pruebas de unión a ovocito y de fertilización *in vitro* heteróloga.

La determinación de la capacidad fecundante del semen es fundamental para optimizar los resultados de las tecnologías de reproducción asistida aplicadas a programas de cría de la especie equina, como la inseminación artificial y la fertilización *in vitro* (Mosqueira, 2012).

Los ensayos de unión a la zona pelúcida (ZP) evalúan la movilidad de los espermatozoides, la capacidad de unión y penetración a ZP, la capacitación espermática y la reacción acrosomal (Katila, 2001). El ensayo de unión puede realizarse con porciones de la ZP (ensayos de hemizona) o con una ZP completa, evaluando la unión de los espermatozoides a la misma, después de un periodo de tiempo (Graham y Mocé 2005). Esta técnica ha sido utilizada en equinos y otras especies para evaluar la capacidad fertilizante del semen congelado-descongelado. Meyers *et al.*, (1996), evaluaron la unión de espermatozoides de tres equinos fértiles y tres equinos subfértiles a la zona pelúcida de ovocitos descongelados, encontrando que el número total de espermatozoides unidos a ZP fue mayor para los sementales fértiles. Del mismo modo, el porcentaje de reacciones acrosómicas en espermatozoides unidos a ZP fue mayor en este grupo de animales.

Sinowatz *et al.*, (2003), demostraron que los espermatozoides porcinos y equinos se unieron y permanecieron fuertemente adheridos a la ZP de ovocitos bovinos luego de un tiempo de incubación relativamente corto (4 horas). Un promedio de 100 espermatozoides porcinos y 150 a 200 de espermatozoides bovinos permanecieron adheridos después de varios lavados intensos. Incluso demostraron que la mayoría de los espermatozoides adheridos sufrió reacción acrosómica. Cabe señalar que para este estudio se utilizaron ovocitos inmaduros, es decir, directamente después de obtenerlos de los ovarios.

Mosqueira (2012), también utilizó el ensayo de unión de espermatozoides equinos a ZP de ovocitos bovinos con semen criopreservado, donde observó la capacidad de los espermatozoides de adherirse a la ZP, determinada mediante la contabilización del número de espermatozoides adheridos por ovocito en 4 horas de interacción. El resultado fue la adhesión de 5-10 espermatozoides/ovocito en un total de 500 ovocitos.

Son escasos los estudios en los que se evalúa la interacción heteróloga de los espermatozoides del burro con ovocitos. Taberner *et al.*, (2010) utilizaron dichos ensayos con buenos resultados para evaluar la capacidad fertilizante del semen de burros de la raza Catalán. En estos experimentos se utilizó semen fresco y congelado-descongelado y se emplearon ovocitos bovinos madurados *in vitro*, sin zona pelúcida. Los resultados de estos autores indican que un 90.12 % de los ovocitos fueron penetrados por espermatozoides con alta viabilidad (en el rango de 60% de viabilidad) de semen fresco y que un 85.40 % de los ovocitos fue penetrado por espermatozoides congelados-descongelados clasificados como alta viabilidad. Estos resultados sugieren, que la penetración heteróloga empleando espermatozoides de burro y ovocitos de bovino es similar si se compara el semen fresco con el congelado-descongelado. Por otro lado, el modelo de fertilización *in vitro* heteróloga ha mostrado ser un buen método para la evaluación de la capacidad fertilizante en burros.

Los ensayos de unión y de fertilización *in vitro* heteróloga, son procedimientos eficaces para determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de burro. Sin embargo, en nuestro país no se reportan investigaciones dirigidas a las biotecnologías aplicables a la especie asnal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El burro es una especie de importancia económica en el medio rural de México debido a que se sigue utilizando para las actividades agrícolas y recreativas y, sigue siendo un medio de transporte en comunidades marginadas o de difícil acceso. No obstante, el inventario nacional de asnos ha sufrido un descenso dramático en las

últimas cuatro décadas y a la fecha no se tienen programas que ayuden a la preservación de esta especie.

En otros países, se han implementado programas de rescate de este animal que incluyen la formación de áreas de reserva para la reproducción de éstos. Además se han hecho bancos de germoplasma y programas de inseminación artificial que ayuden a la propagación de esta especie y que perpetúen el germoplasma a largo plazo.

En este contexto, nos interesamos en establecer protocolos para la congelación del semen de burro, basados en las condiciones que se han establecido para bovinos y equinos, mismas que han logrado conservar los espermatozoides de burro obteniendo aceptables tasas de movilidad y viabilidad.

Un problema que se ha generado son las bajas tasas de fertilidad en la IA en burras poniendo en duda la capacidad fertilizante de los espermatozoides de burro criopreservados. En este trabajo se estudió el empleo de los diluyentes EquiPro® (caballo) y Triladyl® (bovino) para la congelación del semen de burro; se analizó el efecto del plasma seminal en las cualidades de los espermatozoides durante el proceso de congelación y se determinó la capacidad fertilizante mediante las pruebas de fluorescencia con clortetraciclina (CTC) y el ensayo de unión heteróloga.

4. HIPÓTESIS.

Los diluyentes empleados para la congelación de semen bovino (Triladyl) y equino (EquiPro) pueden ser adaptados para la congelación de semen de burro criollo con y sin plasma seminal.

Se espera que con el diluyente EquiPro se obtengan mejores parámetros *in vitro*, con respecto al Triladyl, debido a que su composición está basada en ingredientes lácteos (beta-lactoglobulina y caseinato de calcio), específicos para apoyar la conservación de los espermatozoides equinos.

La presencia del plasma seminal durante la congelación del semen no afectará negativamente los parámetros de viabilidad, movilidad, integridad de la membrana

plasmática y consecuentemente la capacidad de unión heteróloga del espermatozoide de burro criollo congelado-descongelado.

5. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar dos diluyentes comerciales (Triladyl vs EquiPro) en la congelación del semen de burro criollo (*Equus asinus*) (con y sin plasma seminal) mediante la determinación de la movilidad y viabilidad espermáticas, la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide y de la capacidad de unión a ovocitos de cerda.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar los parámetros de movilidad y viabilidad del semen de burro criollo congelado-descongelado, en dos diluyentes comerciales: EquiPro, a base de lactosa-yema de huevo diseñado para caballos; y Triladyl, a base de Tris-yema de huevo diseñado para rumiantes.
- Determinar los parámetros de movilidad y viabilidad del semen congelado mediante dos protocolos: centrifugado y no centrifugado.
- Evaluar los cambios de la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación, mediante microscopia de fluorescencia con CTC.
- Determinar la capacidad fertilizante de los espermatozoides criopreservados mediante ensayos de unión en ovocitos de cerda.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Localización.

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA) y en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la

U.M.S.N.H., misma que se ubica en el Km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán.

7.2. Animales.

Se utilizaron 3 burros criollos en etapa reproductiva (4, 5 y 8 años de edad), dos de ellos con características raciales de Andalúz y el tercero de la raza Catalana. Los animales con un peso de 140-150 kg, fueron desparasitados. Los burros son provenientes de los municipios de Lagunillas y Álvaro Obregón, Michoacán. Su alimentación se basó principalmente en el pastoreo, suplementado con alfalfa, maíz y rastrojo.

7.3. Diseño experimental.

Experimento 1: Con el propósito de evaluar el efecto de los diluyentes, EquiPro Cryoguard® y Triladyl® sobre la movilidad progresiva, la viabilidad y la integridad de la membrana plasmática, se obtuvo un total de 15 eyaculados provenientes de 3 burros criollos. Cada eyaculado se diluyó en EquiPro apx2®, para su mantenimiento a temperatura ambiente durante el transporte hasta el laboratorio; se dividió en 4 fracciones. Las variables movilidad progresiva (MP), viabilidad (V) e integridad de la membrana plasmática, fueron evaluadas en dos momentos: postdilución (PD) y postdescongelación (PC), según se describe en la figura 1.

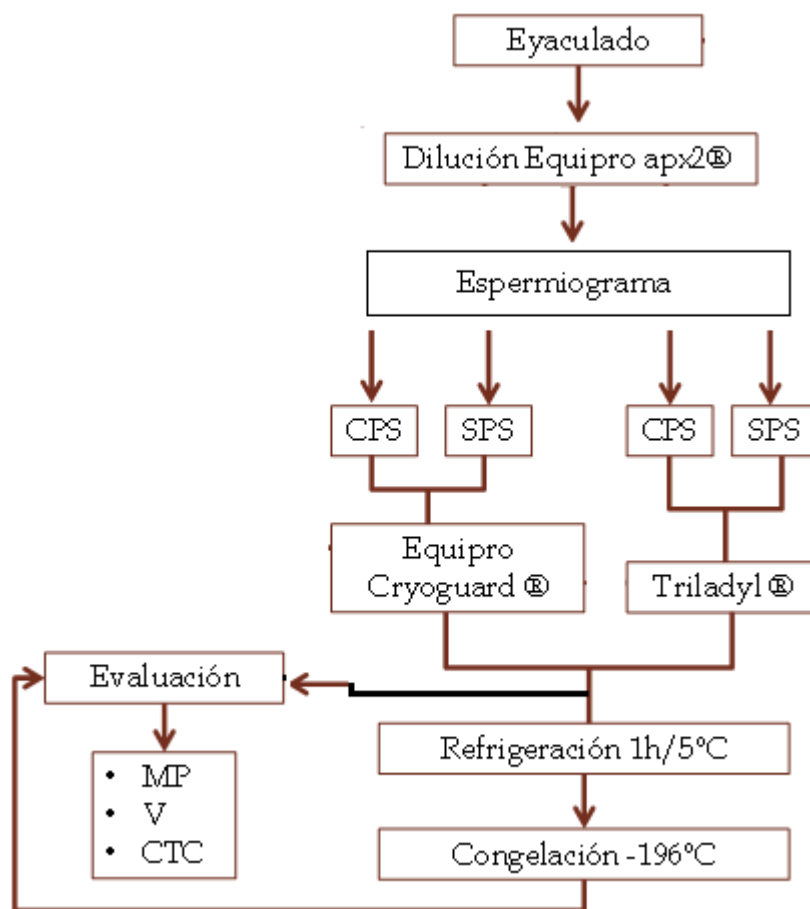


Figura 1. Procedimiento empleado en el experimento 1. CPS: con plasma seminal; SPS: sin plasma seminal; ambos diluidos en EquiPro Cryoguard vs Triladyl; MP: movilidad progresiva; V: viabilidad; CTC: clortetraciclina, para evaluar el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide.

Experimento 2. Se realizaron 2 ensayos para determinar el efecto del diluyente y la centrifugación en la capacidad de unión de espermatozoides de burro a ovocitos de cerda. En el primer ensayo se empleó semen fresco y en el segundo, se comparó el semen congelado con plasma seminal (CPS) vs sin plasma seminal (SPS), en los diluyentes comerciales (Triladyl y EquiPro, respectivamente). Se incubó un total de 100 ovocitos por cada uno de los tratamientos durante 4 horas y posteriormente se determinó el número de espermatozoides unidos por ovocito (figura 2).

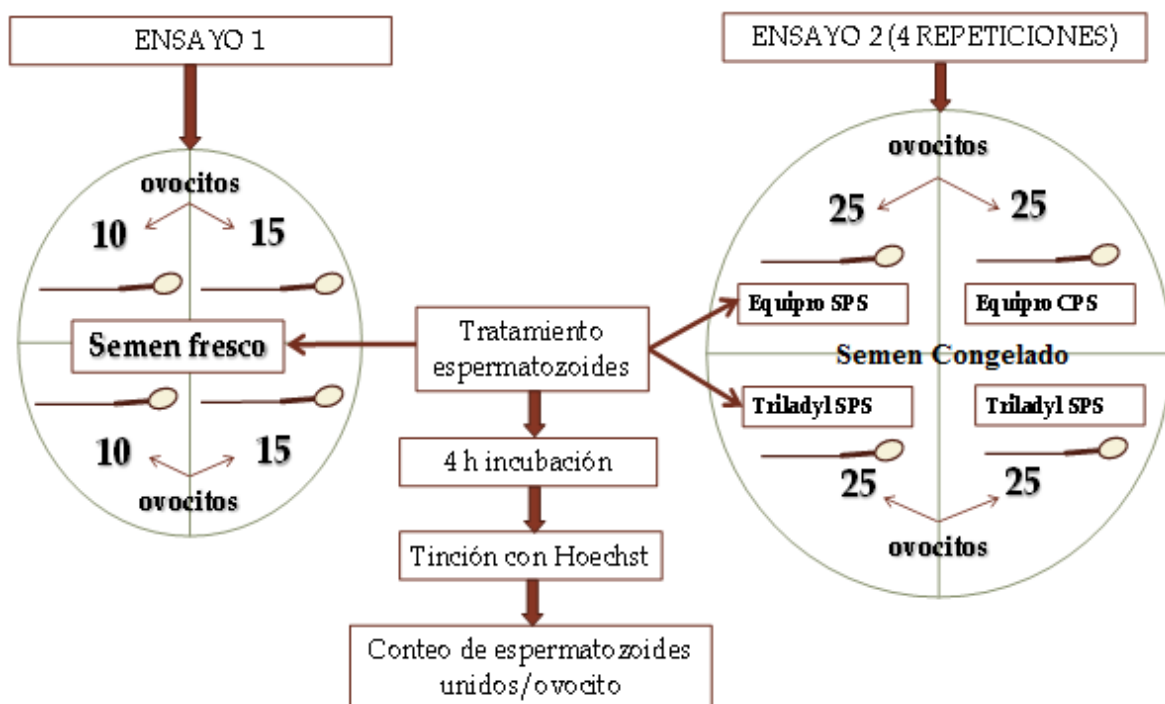


Figura 2. Ensayos de unión espermatozoide-ovocito heterólogo.

7.4. Obtención y evaluación del semen.

Se colectaron 15 eyaculados mediante la técnica de la vagina artificial, modelo Hannover, utilizando una burra en estro como maniquí, cada tercer día. El semen colectado se diluyó en EquiPro Apx2® en una proporción de 1:1, para su transporte hasta el laboratorio.

El semen colectado se evaluó macroscópica (volumen, color y pH) y microscópicamente (movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad, morfología y concentración espermática) (Taberner, 2010).

Cada eyaculado colectado cumplió con los estándares establecidos para equinos. Estos estándares incluyen: movilidad progresiva y viabilidad mayor al 70%, y menos del 20% de anomalías espermáticas. Las características de los eyaculados colectados se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Características de los eyaculados colectados en tres burros criollos.

Nº muestra	Burro	Vol. (ml)	pH	Movilidad masal	% Movilidad progresiva	% Viabilidad	% Morfología	Concentración espermática X10 ⁶
1	Tarímbaro	15	7	5	90	76	12	5,400
2	Carreta	30	7	4	80	75	20	7,200
3	Carreta	35	7	3	80	70	20	8,120
4	Carreta	40	7	3	80	70	9	7,680
5	Lagunillas	15	7	3	80	95	13	2,400
6	Lagunillas	20	7	3	80	95	25	7,200
7	Lagunillas	30	7	4	90	94	18	7,400
8	Lagunillas	30	7	4	90	91	10	6,750
9	Carreta	80	7	3	90	91	10	10,080
10	Lagunillas	30	7	4	80	88	16	6,240
11	Carreta	60	7	3	70	86	18	13,020
12	Carreta	30	7	4	80	88	11	15,600
13	Carreta	30	7	4	80	81	12	9,120
14	Carreta	30	7	4	90	91	29	8,100
15	Lagunillas	30	7	4	80	80	15	6,350
Promedio		33.6	7	3.6	82.6	84.7	15.8	8044

7.5. Criopreservación de semen.

7.5.1. Dilución del semen.

El semen centrifugado y sin centrifugar se diluyó en cada uno en los siguientes diluyentes:

- EquiPro Cryoguard®, suplementado con 20% de yema de huevo.
- Triladyl®, suplementado con 20% de yema de huevo. Diluyente comercial para rumiantes.

Los diluyentes preparados se mantuvieron en baño maría a una temperatura de 37°C durante una hora antes de ser agregados al semen. Posteriormente el semen se envasó en pajillas de 0.5 ml con una concentración de 200×10^6

espermatozoides. Las pajillas se sellaron en uno de sus extremos con alcohol polivinílico para ser colocadas dentro de los Gobelets® (Marca Minitube), para su refrigeración.

7.5.2. Centrifugación del semen.

El semen diluido en EquiPro Cryoguard o en Triladyl se dividió en 2 fracciones:

1ª fracción. Centrifugado a 600 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en uno de los diluyentes para la criopreservación.

2ª fracción. Sin centrifugación y se diluyó directamente en el medio de criopreservación.

7.5.3. Refrigeración del semen diluido.

El semen diluido se mantuvo a una temperatura de 5°C durante 1 hora, período de equilibrio, en el cual las lipoproteínas de la yema de huevo se incorporaron a la membrana plasmática de los espermatozoides para protegerlos contra el choque térmico.

7.5.4. Congelación del semen.

Las pajillas con semen refrigerado se colocaron sobre una rejilla de acero inoxidable y se sometieron a vapor de nitrógeno (-120°C) durante 20 minutos y luego se sumergieron en nitrógeno líquido a -196°C durante 2 minutos y se almacenaron en termos criogénicos de 20 L hasta su evaluación.

7.5.5. Descongelación del semen.

Para descongelar el semen, se tomó una de las pajillas y se mantuvo 30 segundos a baño maría (Fisher Scientific) a 37°C. Después se evaluó la movilidad progresiva y la viabilidad espermática post-descongelación y se determinó el estado funcional de la membrana plasmática.

7.6. Determinación del estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de burro mediante clortetraciclina (CTC) fluorescente.

Se tomaron 100 µl de semen diluido en Equipo y en Triladyl, respectivamente, se depositaron en un tubo de ensaye y fueron centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. El botón de espermatozoides se resuspendió en 100 µl de solución fijadora (Glutaraldehído al 0.2%; en Tris 0.5 M y pH final de 7.4) y se procedió a la tinción con CTC para determinar el estado funcional de las membranas plasmáticas del semen fresco, postdilución y postdescongelación. Se realizó una suspensión de 5 µl de espermatozoides mezclados con 5 µl de CTC en un portaobjetos y se dejó reposar 60 segundos. Finalmente, se agregó una gota de 1.4-Diaza-biciclo (2.2.2) octano (DABCO) [0.22 M] en glicerol al 90%, para conservar la fluorescencia (Fraser y Herold, 1990). Después, la muestra se observó en un microscopio con una lámpara de luz ultravioleta a 495 nm para excitar la CTC. Se determinó el estado funcional de la membrana espermática de acuerdo con los siguientes patrones de fluorescencia:

- a) Espermatozoides no capacitados, con fluorescencia uniforme en la cabeza y acrosoma intacto.
- b) Espermatozoides capacitados, con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y presencia de acrosoma intacto.
- c) Espermatozoides con reacción acrosomal, sin fluorescencia en la cabeza, excepto, una delgada banda en la región ecuatorial.

Se contaron como mínimo 200 células espermáticas.

7.7. Evaluación de la capacidad de unión del espermatozoide de burro a ovocitos de cerda.

7.7.1. Obtención y manipulación de los ovocitos.

La recolección de ovocitos fue a partir de ovarios de cerda sacrificadas en rastro y transportados al laboratorio en solución salina (PBS) a 36-38°C. La recolección de ovocitos se realizó mediante la aspiración de folículos visibles de la superficie del ovario de 3 a 6 mm de diámetro, utilizando una jeringa de 10 ml con una aguja de 18x38 mm. El fluido folicular se recuperó en tubo cónico de 15 ml, dejando sedimentar a 38°C el paquete celular. En medio de manipulación suplementado con TCM-199, bicarbonato y Hepes a un pH 7.3 a 7.4 a temperatura ambiente (25 °C), se sedimentó el paquete celular y se depositó en una caja de Petri de 65 mm, donde se seleccionaron los complejos cumulus-ovocitos (CCOs), utilizando un microscopio estereoscópico, considerando aquellos que presenten 3 o más capas celulares y un citoplasma homogéneo. Los complejos CCOs se lavaron tres veces en gotas de 500µl de medio de manipulación previamente equilibrado a 38.5°C, en una atmósfera saturada a humedad y 5% de CO₂ al menos 3 h.

Posteriormente las células de la cúmulos oophorus fueron removidas con 0.1% de hialuronidasa en vórtex, dejando solo el ovocito con la zona pelúcida desnuda.

7.7.2. Preparación de los espermatozoides.

Los espermatozoides se descongelaron a 37°C durante 30 segundos y fueron centrifugados a 1000 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue removido y el pellet se resuspendió en 4 ml de medio de centrifugación (EquiPro Apx2®) y fue centrifugado nuevamente. Los espermatozoides fueron contados en un hemocitómetro y diluidos en un volumen apropiado de medio de fertilización para dar una concentración final de 2×10^6 por ml.

7.7.3. Ensayo de unión de espermatozoides de burro en ovocitos de cerda.

Para llevar a cabo el ensayo de unión, se emplearon un total de 450 ovocitos de cerda libres de células de la granulosa. Se colocaron 25 ovocitos en pozos conteniendo 500 μ l de medio de fertilización y fueron incubados con los espermatozoides descongelados. Se utilizaron cajas de cuatro pozos de fondo redondo (Marca Nunc) y la solución Tiroides como medio de fertilización *in vitro*, suplementada con 25mM bicarbonato de sodio, 22mM Na-lactato, 1mM Na piruvato, 6mg/ml de BSA libre de ácidos grasos. Las microgotas de medio de fertilización se cubrieron con aceite mineral y se incubaron a 38.5°C en 5% de CO₂ durante 4h. Transcurrido el tiempo los ovocitos con los espermatozoides fueron lavados en medio PBS suplementado con 0.3% de BSA y fueron mezclados vigorosamente por 5 segundos a efecto de eliminar las uniones débiles de los espermatozoides a la zona pelúcida (ZP). Posteriormente los ovocitos se tiñeron con el fluorocromo Hoechst 33248 durante 3 min, para ser evaluados al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss) y determinar el número de espermatozoides que se unieron a la zona pelúcida o que penetraron la membrana del ovocito.

7.8. Análisis estadístico.

Para la evaluación de los parámetros de calidad espermática y del estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, se utilizó un análisis de varianza de bloques multivariados (referencia). Para analizar la capacidad de unión espermatozoide-ovocito se realizó un análisis de varianza de una vía y una prueba *pos hoc* de Tukey (referencia).

8. RESULTADOS

8.1. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con y sin plasma seminal en la movilidad progresiva y viabilidad espermática, postdilución y postdescongelación.

El tipo de diluyente y su interacción con el plasma seminal, no afectó significativamente ($p>0.05$) la movilidad progresiva y la viabilidad del semen diluido. Los valores promedio de ambas variables fueron muy similares entre tratamientos, encontrándose arriba del 70%. Tampoco hubo un efecto significativo ($p<0.05$) de la presencia del plasma seminal, dentro de cada diluyente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) o sin plasma seminal (SPS) en la movilidad progresiva y viabilidad espermática del semen diluido (n=15).
(Promedio $\pm$ DE)

Variable	Tratamiento			
	EquiPro		Triladyl	
	SPS	CPS	SPS	CPS
Movilidad progresiva (%)	76.3 $\pm$ 7.4 ^a	73.0 $\pm$ 6.2 ^a	72.0 $\pm$ 10.7 ^a	73.3 $\pm$ 5.6 ^a
Viabilidad (%)	76.1 $\pm$ 9.6 ^a	77.7 $\pm$ 8.0 ^a	79.1 $\pm$ 7.9 ^a	78.9 $\pm$ 7.1 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas en $p<0.05$.

El tipo de diluyente y su interacción con el plasma seminal, no afectó significativamente ($p>0.05$) los parámetros de movilidad progresiva y viabilidad espermática del semen congelado. Los porcentajes de movilidad progresiva se mantuvieron superiores al 30% postdescongelación y la viabilidad mayor al 60%, siendo muy similares en cada uno de sus tratamientos. No hubo un efecto significativo ($p<0.05$) de la presencia del plasma seminal, dentro de cada diluyente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) o sin plasma seminal (SPS) en la movilidad progresiva y viabilidad espermática en el semen congelado (n=15).
(Promedio±DE)

Variable	Tratamiento			
	EquiPro		Triladyl	
	SPS	CPS	SPS	CPS
Movilidad progresiva (%)	35.7± 10.7 ^a	31.3 ±9.2 ^a	40.3 ± 9.9 ^a	37.3 ±8.0 ^a
Viabilidad (%)	67.7 ±9.1 ^a	65.0 ±11.6 ^a	66.6 ± 10.6 ^a	66.5 ±8.9 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas en $p < 0.05$.

8.2. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con y sin plasma seminal en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, postdilución y postdescongelación.

Se determinaron tres estados funcionales de la membrana plasmática del espermatozoide de burro criollo: no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal, donde los valores obtenidos fueron muy similares entre los tratamientos.

En el semen diluido no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diluyentes y su interacción con el plasma seminal en el porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal en el semen diluido. Los espermatozoides no capacitados y capacitados mostraron valores muy similares en cada uno de los tratamientos, del 43.1 al 50.5%. El porcentaje de los espermatozoides con reacción acrosomal fue de 4.8 y 6.5% no existiendo diferencias entre tratamientos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) y sin plasma seminal (SPS) en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide del semen diluido (n=15).
(Promedio±DE)

Estado funcional de la membrana plasmática	Tratamiento			
	EquiPro		Triladyl	
	SPS	CPS	SPS	CPS
No capacitados (%)	43.1 ± 11.6 ^a	46.9 ± 9.6 ^a	47.7 ± 14.4 ^a	48.8 ± 12.9 ^a
Capcitados (%)	50.5 ± 11.8 ^a	46.9 ± 9.4 ^a	45.9 ± 13.8 ^a	46.1 ± 12.4 ^a
Reacción Acrosomal (%)	6.5 ± 4.6 ^a	6.1 ± 2.9 ^a	6.5 ± 4.5 ^a	4.8 ± 3.8 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas en $p < 0.05$.

En el semen congelado, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diluyentes y su interacción con el plasma seminal en el porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal. El porcentaje de espermatozoides no capacitados en el semen congelado va del 25.8% al 31.5%, estos valores son muy similares entre los tratamientos por lo que no se encontraron diferencias significativas. De igual manera, los porcentajes de espermatozoides capacitados son muy similares con valores mayores al 60%. Respecto a los espermatozoides con reacción acrosomal, estos porcentajes se encuentran entre el 8.3% al 10.5% resultando ser muy similares en cada uno de los tratamientos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del tipo de diluyente y su interacción con (CPS) y sin plasma seminal (SPS) en el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide congelado de burro criollo (n=15).
(Promedio $\pm$ DE)

Estado funcional de la membrana plasmática	Tratamiento			
	EquiPro		Triladyl	
	SPS	CPS	SPS	CPS
No Capacitados	27.1 $\pm$ 5.7 ^a	26.5 $\pm$ 6.8 ^a	31.5 $\pm$ 5.8 ^a	25.8 $\pm$ 7.3 ^a
Capacitados	62.8 $\pm$ 6.6 ^a	64.9 $\pm$ 7.7 ^a	60.1 $\pm$ 8.4 ^a	63.7 $\pm$ 8.6 ^a
Reacción Acrosomal	10.1 $\pm$ 4.3 ^a	8.6 $\pm$ 1.8 ^a	8.3 $\pm$ 4.7 ^a	10.5 $\pm$ 3.9 ^a

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas en $p < 0.05$.

8.3. Ensayo de unión espermatozoide-ovocito de cerda *in vitro*.

En 450 ovocitos de cerda se contabilizó el número de espermatozoides que se unieron fuertemente a la zona pelúcida desnuda del ovocito, después de varios lavados para retirar los espermatozoides con uniones débiles.

Los resultados obtenidos en este ensayo (figura 1), indican que el número de espermatozoides/ovocito en el semen fresco fue de 2.38 y fue similar ($p > 0.05$) a los valores obtenidos en Triladyl y EquiPro CPS. Cuando se utilizó semen congelado en los ensayos, los resultados indican que hubo un efecto significativo ($p < 0.05$) de la centrifugación sobre la capacidad de unión de los espermatozoides descongelados a los ovocitos de cerda dentro de cada diluyente. Cuando el semen SPS se diluyó en EquiPro, el número de espermatozoide unidos/ovocito fue de 5.2, mientras que CPS fue de 1.2 espermatozoides/ovocito. De manera similar, el semen diluido en Triladyl SPS resultó en 4.83 espermatozoides/ovocito y cuando se mantuvo CPS, fue de 2.98 espermatozoides/ovocito.

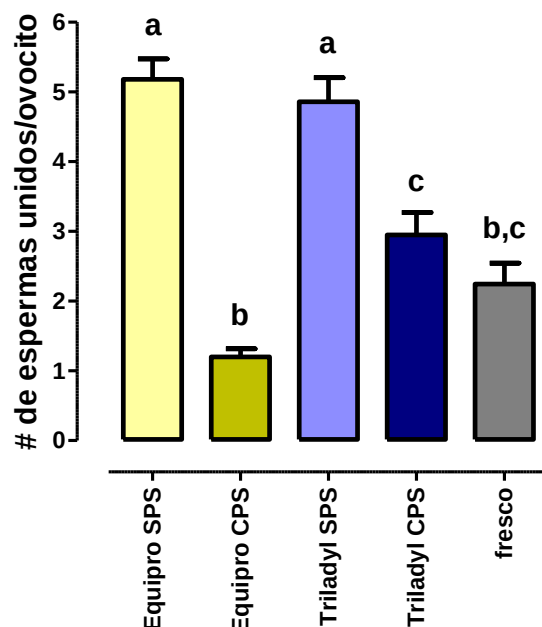


Figura 3. Ensayo de unión *in vitro* de espermatozoides de burro a ovocitos de cerda. Las letras diferentes indican que los datos son estadísticamente significativos $P < 0.05$.

Por último, cuando se utilizó el semen congelado en los ensayos, no hubo diferencias estadísticamente ($p > 0.05$) entre Triladyl SPS o con Equipro SPS, pero si hubo un menor número de espermatozoides unidos al ovocito en el Equipro CPS con respecto al Triladyl CPS, siendo las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) (figura 3)

En las figuras 4 y 5 se muestran fotografías del ensayo de unión heteróloga, de acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 3.

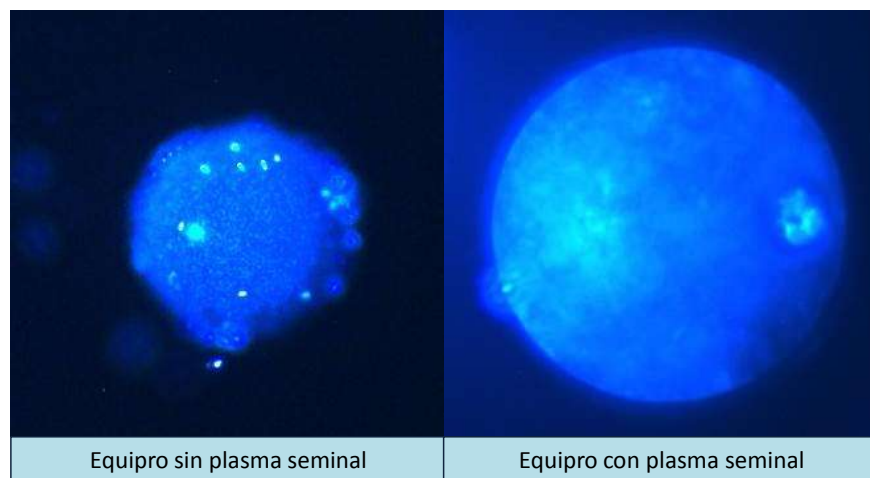


Figura 4. Unión de espermatozoides descongelados de burro a ovocitos de cerda con el diluyente EquiPro. Los puntos fluorescentes indican las cabezas de los espermatozoides adheridas a los ovocitos.

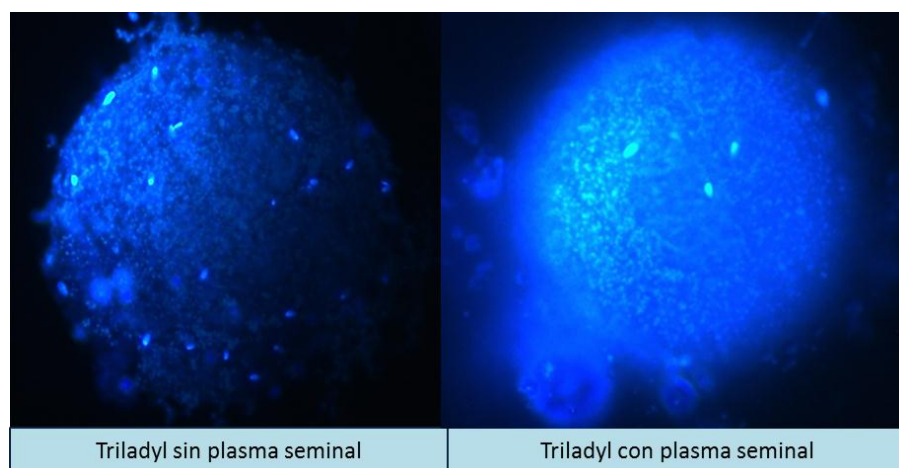


Figura 5. Unión de espermatozoides descongelados de burro a ovocitos de cerda con el diluyente Triladyl. Los puntos fluorescentes indican las cabezas de los espermatozoides adheridas a los ovocitos.

9. DISCUSIÓN.

Los resultados del presente trabajo muestran que es indistinto diluir el semen de burro criollo en EquiPro o Triladyl, ya que la movilidad progresiva y la viabilidad espermática fueron similares en ambos diluyentes (cuadro 5). Esto era de

esperarse, debido a que el tiempo de contacto del semen con los componentes de cada diluyente fue muy breve y no pudieron ejercer alguna acción sobre los espermatozoides diluidos. Los resultados de movilidad progresiva coinciden con los de Pagl *et al.*, (2006) quienes tampoco encontraron diferencias cuando el semen de caballo fue diluido respectivamente en solución salina bufer-fosfato (PBS), Kenney, EquiPro y EquiPro *plus*; evaluado a las 0 horas de dilución, a pesar de las notables diferencias en la composición química entre la PBS y el resto de los diluyentes, diseñados como conservadores del semen equino.

La separación del plasma seminal del semen diluido, no ofreció ventajas en la movilidad progresiva, ni en la viabilidad espermática, con respecto al semen completo (CPS) (cuadro 5). Este hallazgo es importante en caso de usarse el semen fresco diluido en la inseminación artificial de burras.

Igualmente, el uso del EquiPro o del Triladyl en la congelación del semen de burro produjo una movilidad progresiva y viabilidad espermática similares (mayores al 30% y 60%, respectivamente), lo que sorprende porque, se esperaba que el primero fuera mejor que el segundo, ya que es un diluyente con componentes lácteos, específico para equinos.

Trabajos como los de Canisso *et al.*, (2011) y Trimeche *et al.*, (1998) donde se reportan movilidades que van del 37% al 56.6%, respectivamente, en semen de burro postdescongelación, confirman el uso de diluyentes basados en componentes lácteos. Qeusada *et al.*, (2012) utilizaron un diluyente comercial llamado Gent® (también con una composición láctea) en la congelación de semen de burro y con resultados similares a EquiPro y Triladyl (36% de MP y 63% de V), en el presente trabajo.

Estos resultados sugieren que el Triladyl contiene sustancias que son tan eficientes como los diluyentes anteriores para la conservación y sobrevivencia de los

espermatozoides de burro, siendo una opción más para los protocolos de congelación en esta especie.

En el presente trabajo, los porcentajes de espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal, tanto en semen diluido como en congelado, fueron muy similares entre los diluyentes con presencia o ausencia del plasma seminal. En todos los tratamientos los porcentajes de espermatozoides fértiles (no capacitados y capacitados) fueron superiores al 40%, mientras que los porcentajes de espermatozoides con reacción acrosomal fueron menores a 10.5. Cabe destacar que la congelación del semen aumentó el porcentaje de espermatozoides capacitados en un 15% aproximadamente, con respecto al semen diluido, mientras los espermatozoides con reacción acrosomal se mantuvieron en el mismo nivel, en todos los tratamientos.

Estos resultados indican que los diluyentes EquiPro y Triladyl son útiles en la congelación de semen de burro sin que afecte el estado funcional de la membrana espermática.

En el presente trabajo, los hallazgos indican que la presencia del plasma seminal no es un factor que afecte los parámetros de calidad seminal, tales como la movilidad progresiva, la viabilidad y el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. Sin embargo, la presencia del plasma seminal si afectó la capacidad fertilizante de los espermatozoides de acuerdo con los resultados de los ensayos de unión heteróloga (ensayos de interacción gamética burro-cerdo). Esto puede deberse a que los componentes del plasma seminal afecten la interacción del espermatozoide con el ovocito retardando los procesos de reacción acrosomal y consecuentemente, la unión o penetración de este en el ovocito; por lo que se recomienda separar el plasma seminal mediante centrifugación, en los procesos de fertilización *in vitro* o inseminación artificial.

El ensayo de unión heteróloga también mostró que tanto el Tryladil como el EquiPro empleado como diluyentes para la congelación de semen SPS dieron los mejores resultados. Cuando se emplearon estos mismos diluyentes en la congelación de semen completo (CPS) fue mejor el Triladyl. Sin embargo, bajo las condiciones de México es preferible usar éste diluyente por razones económicas. Estos datos sugieren la existencia de componentes en el Triladyl que reviertan o disminuyan el efecto del plasma seminal en los espermatozoides de burro y faciliten la interacción gamética *in vitro*.

Los ensayos de unión heteróloga *in vitro* espermatozoide-ovocito utilizando ovocitos de cerda, fue muy similar a los realizados por Mosqueira (2012) en cuanto al número de espermatozoides unidos/ovocito (5-10), sin embargo, difiere en el uso de ovocitos de bovino y determinar la capacidad fertilizante en equinos.

Un dato interesante es el que se obtuvo en los ensayos de unión heteróloga, en los que determinamos que las condiciones de congelación, remoción de plasma seminal y EquiPro son las que mantuvieron la capacidad fertilizante más alta, incluso por encima de la capacidad fertilizante del semen fresco. Estos resultados sugieren que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides de burro, podría estar induciendo la capacitación espermática, de acuerdo a lo que han reportado en otras especies (Chenoveth, 2000; Maxwell y Watson, 1996). Respecto a la presencia del plasma seminal, los datos sugieren que es en detrimento de la interacción ovocito-espermatozoide.

10. CONCLUSIONES.

1. El EquiPro y el Triladyl mantuvieron los mismos valores en movilidad progresiva, viabilidad y estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide de burro, postdilución y postdescongelación.

2. La separación del plasma seminal por centrifugación, no favoreció los parámetros de movilidad progresiva, viabilidad y el estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de burro, durante la postdilución, ni la congelación, pero si favoreció la capacidad de unión de los espermatozoides a ovocitos de cerda, en ambos diluyentes.
3. El ensayo de unión demostró que el Triladyl genera mejores resultados que el EquiPro solo en presencia del plasma seminal.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Aldana C.A. (2011). Capacidad fertilizante del semen criopreservado de perro doméstico (*Canis familiaris*) mediante fertilización *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Aluja, A.S. de; Pérez G.T. and López F.; (2005). Live weight estimation of donkeys in central Mexico from measurement of thoracic circumference. *Tropical Animal Health and Production*. 37:159-171.
- Álvarez, A.L., Serres, C., Torres, P., Crespo, F., Mateos, E., and Gomez-Cuetara, C. (2006) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 94:89-91.
- Aranguren M.J., Jordana J., Gomez M. (2002). Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *Journal Animal Breed Genetic*. 119 (4): 256-263.
- Arriaga, J. C., Velázquez B. L., Felipe P. Y., Zamora R. V., Keyserling, A. V. and Ann P. R. (2003). Los équidos de trabajo en comunidad campesina mazahua de ladera en el altiplano mexicano. En: *Investigación en Animales de Trabajo para el Desarrollo Rural*. Compilado por: Arriaga J.C. et al., 221-

268. Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias, UAEM. Toluca, Estado de México.
- Aurich C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89:65-75.
- Ávila, A.R. (2009). Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Batellier F. M. (1997). Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équins. *Thèse de Docteur*. Université François Rabelais de Tours, UFR Sciences et Techniques,
<http://wcentre.tours.inra.fr/prc/internet/resultats/theses/batellier/pagetitre.htm>
- Batellier F., Vidament M., Fauquant J., Duchamp G., Arnaud G., Yvon J.M., Magistrini M., Squires E.L. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68:181-190.
- Beja P.A., England P.R., Taberlet P., Luikar G., Ferrand N., Jordan S., Bakhiet A.O., Abdalla M.A., Mashkour M. (2004). El asno doméstico se originó en África.
<http://www.eurekalert.org/>
- Boeta M., Zarco L.Q. (2000). Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Veterinaria México* 31 (1):67-69.
- Brinsko S. y Vanner D.D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. Stallion management vet clinics North America: Equine Practice. 205-218.

- Canisso I.F. (2008). Comportamento sexual, Parâmetros Seminais e Fertilidade do semen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raca Pega. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Viçosa: Universidade Federal de Vicoso. P. 200.
- Canisso I.F., Carvalho G.R., Torres C.A.A., Guimarães J.D., Souza F.A., Silva E.C., Martins L.F. (2008a). Sexual behavior of jacks when an estrous mare is used in semen collection. *Animal Reproduction Science*. (107): 314-314.
- Canisso I.F., Andrade S.F., Ortigoza E.J.M., Ribeiro G., Davies M.M.C., Capistrano E., Domingos G.J., Linhares L.A. (2008b). Freezing of donkey semen (*Equus asinus*). *Revista Investigación Veterinaria*. 19 (2):113-125.
- Canisso I.F., Carvalho G.R., Morel M.D., Ker P.G., Rodriguez A.L., Silva E.C., Da Silva M.A.C. (2011). Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey Jack semen after insemination of horse mares. *Equine Veterinary Journal*. 43 (2): 179-183.
- Canisso I.F., McDonnell S.M. (2010). Comportamiento de apareamiento en asnos con énfasis en la raza Pêga. In: *Veterinary Care of Donkeys*, Matthews N.S. and Taylor T.S. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org)
- Cecchi F., Ciampolini R., Ciani E., Matteoli B., Mazzanti E., Tancredi M., Presciuttini S. (2006). Demographic genetics of the endangered Amiata donkey breed. *Italian Journal of Animal Science*. (5): 387-391.
- Chenowet P.J. (2000). Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New, Cork, U.S.A.

- Cottorello A.C.P., Amancio R.C., Henry M., Borges I. (2002). Effect of storage temperature and extenders on in vitro activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*. (58): 325-328.
- FAO (2010). Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal production and health guidelines N°12. Roma.
- Fraser L., Herold E. (1990): Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *Molecular Reproduction Development*, 40:233-241.
- Graham J., Mocé E. (2005) Fertility evaluation of frozen/ thawed semen. *Theriogenology*. (64): 492-504.
- González R. M. (2013). Validación de un protocolo de Congelación de semen equino con un diluyente comercial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- INEGI (1994). México. Resultados definitivos. VII Censo Agrícola-Ganadero 1991
- INEGI (2007). Existencias de animales de otras especies por entidad y municipio. *Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007*. En Línea. Fecha de consulta 25 marzo 2014.
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>
- Janett F., Keo S., Bollwein H., Hässig M., Thun R. (2005) Comparison of AndroMedâ, Bioxcellâ and Triladylâ extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch. Tierheilk*. 147: 62 (Abstract, Poster).

- Jordana, J. y Folch P. (1998). La raza asnal Catalana: programa de conservación y mejora de una población en peligro de extinción. *Archivos de Zootecnia*. 47: 403-409.
- Kareskoski M. and Katila T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, 107: 249–256.
- Katila T. (2001). *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Vet Scand*. 42(2): 199-217.
- Katila T, Anderson M, Reilas T, Koskinen E. (2002) Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*. (58): 241-244.
- Kenney R.M., Bergman R.V., Cooper W.L., Morse G.W. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Pract*. (21): 327-336.
- Klug, E. (1992). Routine AI application in Hannoverian Sport Horse Breeding Association. *Animal Reproduction Science*. (28): 39-44.
- Krause D., Grove D. (1967). Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *Journal Reproduction Fertility*. (14): 139-141.
- Kreuchauf A. (1984). Reproductive physiology in the jackass. *Animal Research Development*. (20): 51-78.
- Kugler W., Grunenfelder H-P. and Broxham E., (2008). Donkey Breeds in Europe. Inventory, Description, Need for Action, Conservation. Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe and Save Foundation. <http://www.save-foundation.net/pdf/donkey.pdf>

- López L, C., Alonso, R. and de Aluja, A.S., (2005). Study of the genetic origin of the Mexican Creole donkey (*Equus asinus*) by means of the analysis of the D-Loop region of mitochondrial DNA. *Tropical Animal Health and Production*, 37(Suppl. 1), 173-188.
- Martim J.C., Klug E., Gunzel A.R. (1979). Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal Reproduction Fertility* (Suppl. 27). 47-51.
- Maxwell W.M.C. y Watson P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. (42): 55-65.
- Medina L.J. (2010). La extinción del burro en México.
www.enlacemexico.info/index.php?...burro-en-mexico
- Meyers S., Liu I., Overstreet J., Vadis S., Drobnis E. (1996). Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: Comparisons between fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*. (46): 1277-1288.
- Miró J., Taberner E., Rivera M., Peña A., Medrano A., Rigau T., Peñalba A. (2009). Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* (72): 1017-1022.
- Mosqueira P.T.J. (2012). Evaluación de los efectos de diluyentes de congelación de semen sobre la capacidad de unión de espermatozoides equinos a zona pelúcida de ovocitos bovinos. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Valdivia, Chile. 6-17.
- Neild D.M., Gadella B.M., Chávez M. J., Miragaya M.M., Colenbrander B. and Agüero A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-

thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59 (8): 1693-1705.

Ochoa, F.A. (2010) Evaluación de Agentes Crioprotectores para la Criopreservación del semen de Guajolote (*Meleagris gallopavo*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Oliveira J.V., Alvarenga M.A., Melo C.M., Macedo L.M., Dell'Aqua J.A., Papa F.O. (2006). Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* (94): 82–84.

Orozco C.V., Rosemberg B.M., Santiani A.A., Tomatis K.M., Rodríguez L.H. (2011). Evaluación de dos dilutores para la criopreservación de semen de caballo peruano de paso y sus efectos sobre la motilidad espermática e integridad funcional de la membrana. *Científica*. 8 (3): 209-219.

Pagl R., Aurich E.J., Muller-Schlosser F., Kankofer M., Aurich C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5° C. *Theriogenology*. 66: 1115–1122.

Parks J.E and Lynch D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29: 255-266.

Piao S., Wang Y., Cheng Y. (1988). A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: XI ICAR Meeting. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin.

- Pierce B.A. (2010). Genética: un enfoque conceptual. 3ra edición, Ed. Médica panamericana. Madrid, España. 578-579.
- Pillet E., Batellier F., Duchamp G., Furstoss V., LE Vern Y., Kerboeuf D., Vidament M., Magistrini M. (2008). Freezing stallion semen in INRA 96 based extender improves fertility rates in comparison with INRA 82. *Dairy Science and Technology*, 8 (2): 257-265
- Pineda G. S. y Pinilla A.S.M. (2007). Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; INRA-dimetilformamida-yema de huevo) en la preservación de semen equino. Universidad de la Salle, Facultad de Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia.
- Pizarro L.E., Restrepo B.G., Echeverry Z.J., Rojano B. (2013). Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen equino criopreservado. *Revista MVZ Córdoba*. (18): 3672-3680.
- Polge C., Minotakis C. (1964). Deep freezing of jackass and stallion semen. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 545-552.
- Qeusada F., Dorado J., Acha D., Ortíz I., Urbano M., Ramírez L., Galvez M.J., Alcaraz L., Portero J.M., González C., Demyda-Peuras S., Hidalgo M. (2012). 14 freezing of donkey semen after 24 hours of cool storage: preliminary results. *Reproduction Fertility and Development*. 25 (1): 154.
- Raphael C.F. (2007). Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 111.

- Rathi R., Colenbrander B., Bevers M.M., Gadella B.M. (2001). Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction*. (65): 462-470.
- Rizzi R., Tullo E., Cito A.M., Caroli A., Pieragostini A.O. (2011). Monitoring of genetic diversity in the endangered Martina Franca donkey population. *Journal Animal Science*. (89):1304
- Rota A., Magelli C., Panzani D., Camillo F. (2008). Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology*. (69) 176-185.
- Rota A., Panzani D., Sabatini C., Camillo F. (2012). Donkey Jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, postbreeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*. 78 (8) 1846-54.
- SAGARPA 2002. Informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios (RGP) de México.
- Secretaria de Industria y Comercio (SIC). Dirección General de Estadística (1975). V Censo Agrícola, Ganadero y Ejidal. México.
- Salisbury G.W., VanDemark N.L., Lodge J.R. (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2ª edición, Ed. Acribia, 518-519.
- Santiago M.J., López S.A. (2010). Ungulados Silvestres de España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. Monografía INIA: Serie Medioambiental N°2. Madrid, España. 85-195.
- Serres C., Rodríguez A., Álvarez A.L., Santiago I., Gabriel J., Gómez-Cuétara C., Mateos E. (2002). Effect of centrifugation and temperature on the motility

and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. *Theriogenology*. (58): 329-332.

Starkey P. (1995_a). The donkey in South Africa: myths and misconceptions. Animal traction in South Africa: empowering rural communities. <http://www.animaltraction.com/StarkeyPapers/Starkey-Donkeys-in-SouthAfrica-myths.pdf>

Starkey P. (1995_b). Animal traction in South Africa. Empowering rural communities. South African Network of Animal Traction (SANAT) and Development Bank of Southern Africa. Gauteng, South Africa.

Starkey P. and Starkey M. (2000). Regional and world trends in donkey populations. In: Starkey P. and Fielding D. (eds). *Donkeys, People and Development*. 10-21 Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA). ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), Wageningen, The Netherlands.

Sinowatz F., Wesa E., Neumüller C., Palma G. (2003). El dogma de especificidad de especie en la unión y penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. *Reproduction Domestic Animal*. (38): 141-146.

Taberner E., Morató R., Mogas T., Miró J. (2010). Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction Science*. (118) 354-361.

Taberner BE. (2010). Tecnologías reproductivas aplicadas a la conservación del burro Català. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

Toscano, TIA (2005) Efecto de la congelación-descongelación del semen utilizado en un diluyente para bovino sobre estado funcional de la membrana

plasmática del espermatozoide ovino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

Trimeche A., Renard P., Tainturier D. (1998). A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*. (50): 793-806.

Velasco M.R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 3 (1):15-16.

Vidament M. (2005). French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*. (89): 115-136.

Vidament M., Vincent P., Yvon J.M., Bruneau B., Martin F.X. (2005). Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asinine and equine. *Animal Reproduction Science* 89: 302-305.

Vidament M., Vicent P., Martin F.X., Magistrini M., Blebois E. (2008). Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*.

Villegas D.G., Bolaños M.A., Olguín P.L. (2001). La Ganadería en México. Capítulo IX: Équidos. Textos selectos de geografía de México. Ed. Plaza y Valdés. México, D.F.158.