



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:

Blanca Gabriela Landi Loja

CI: 1450070147

Correo electrónico: gabylandi1836@gmail.com

Edisson Leonardo Mejía Jara

CI: 0104083738

Correo electrónico: edisson.mejia9@gmail.com

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero Ph.D.

CI: 0103912846

Cuenca, Ecuador

17-septiembre-2021



RESUMEN

Esta investigación evaluó dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios caninos sobre la criosupervivencia celular, uno convencional (CC) que usa vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático, y otro ultrarrápido (CU) que sumerge directamente gotas de esperma (30 µL) en NL₂. Para este propósito, se usaron 60 epidídimos de 30 perros adultos orquiectomizados. Las muestras fueron recuperadas por flujo retrógrado y entonces se conformó 30 agrupaciones (3 muestras epididimarias / agrupación). Cada agrupación fue dividida en 2 alícuotas que fueron criopreservadas por CC y CU, usando glicerol (5%, v/v) y sacarosa (250 mM), respectivamente, adicionados al diluyente TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa + 20% yema de huevo). Los resultados mostraron que el protocolo CU produjo menores porcentajes ($P < 0,05$) de motilidad total y progresiva e integridad de membrana acrosomal que el protocolo CC. Sin embargo, las variables cinéticas (velocidades curvilínea y rectilínea, rectitud, linealidad, oscilación, amplitud lateral de la cabeza y frecuencia de batida de flagelo) e integridad de la membrana plasmática (viabilidad) no difirieron ($P > 0,05$) entre ambos métodos de congelación. Eficientemente, el protocolo de congelación CU no varió ($P > 0,05$) el largo, ancho, área y perímetro de la cabeza espermática con respecto a los valores sin congelar. En conclusión, el protocolo CU afecta la motilidad en comparación con el protocolo CC, no obstante, el logro de los niveles de cinética y viabilidad junto con el mantenimiento de las dimensiones morfométricas de la cabeza abre buenas expectativas para su uso en la criopreservación eficiente de espermatozoides epididimarios de caninos domésticos y silvestres.

Palabras clave: Espermatozoides caninos. Epidídimo. Criopreservación. Congelación convencional. Congelación ultrarrápida.



ABSTRACT

This study was aimed to assess two canine epididymal sperm freezing protocols on cryosurvival, one conventional (CF) that uses static liquid nitrogen (LN₂) vapors, and another ultra-rapid (UF) that directly plunges drops (30uL) of sperm in LN₂. For this purpose, sixty epididymides from 30 orchiectomized adult dogs were used. The sperm samples were retrieved by retrograde flushing and then thirty pools were conformed (3 epididymal samples/pool). Each pool was divided into 2 aliquots that were cryopreserved with both CF and UF protocols using either 5% glycerol and 250 mM sucrose, respectively, added to the TCG-EY extender (tris, citric acid, glucose plus 20% egg yolk). The results showed that the UF protocol produced lower motility (total and progressive) and acrosomal membrane integrity ($P < 0.05$) than the CF protocol. However, the kinetic variables (curvilinear and rectilinear velocities, straightness, linearity, oscillation, the amplitude of lateral head displacement and beat-cross frequency) and plasma membrane integrity (viability) did not differ ($P > 0.05$) between both cryopreserving protocols. Efficiently, the UF protocol did not vary ($P > 0.05$) the length, width, area, and perimeter of the sperm head with respect to the non-frozen values. In conclusion, the UF protocol affects motility compared to the CF protocol. Despite this, the achievement of kinetics and viability levels in conjunction with the invariance of the morphometric head dimensions opens up good expectations for its use in the efficient cryopreservation of epididymal sperm from domestic and non-domestic canines.

Keywords: Canine sperm. Epididymis. Cryopreservation. Conventional freezing. Ultra-rapid freezing.



ÍNDICE

Acrónimos.

1.	INTRODUCCIÓN	18
2.	OBJETIVOS	22
2.1.	Objetivo general.....	22
2.2.	Objetivos específicos	22
3.	REVISIÓN DE LITERATURA	23
3.1.	ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.....	23
3.1.1.	Testículos	23
3.1.2.	Cordón espermático	23
3.1.3.	Epidídimo.....	23
3.1.4.	Estructura del epidídimo	23
3.1.5.	Espermatozoides epididimarios	24
3.2.	FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA	25
3.2.1.	Maduración.....	25
3.2.2.	Capacitación.....	26
3.2.3.	Reacción acrosomal	26
3.3.	ESTRUCTURA ESPERMÁTICA.....	26
3.3.1.	Cabeza	27
3.3.2.	Pieza media	27
3.3.3.	Cola espermática.....	27
3.3.4.	Vaina mitocondrial	27
3.3.5.	Membrana del espermatozoide	28
3.3.5.1.	Composición lipídica	28
3.3.5.2.	Composición proteica.....	29
3.4.	OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES CANINOS.....	29



3.5.	RECOLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN.....	29
3.6.	CRIOPRESERVACIÓN.....	29
3.6.1.	Criopreservación de espermatozoides	30
3.6.2.	Principios de la Criopreservación	30
3.6.3.	Diluyentes.....	30
3.6.4.	Crioprotectores	31
3.6.5.	Congelación convencional.....	31
3.6.6.	Vitrificación y congelación ultrarrápida	32
3.7.	Evaluación de calidad espermática por el sistema CASA.....	33
3.7.1.	Análisis de concentración y motilidad	34
3.7.2.	Integridad de la Membrana Plasmática	35
3.7.3.	Análisis de morfometría	35
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.1.	Materiales	38
4.1.1.	Materiales Físicos.....	38
4.1.2.	Materiales Biológicos.....	38
4.1.3.	Materiales Químicos.....	38
4.1.4.	Materiales de Laboratorio	39
4.2.	Métodos	40
4.2.1.	El área de estudio.....	40
4.2.2.	Ubicación política-geográfica.....	40
4.2.3.	Unidad experimental y diseño experimental	40
4.2.4.	Metodología para la Investigación	41
4.2.5.	Desarrollo de la investigación:.....	42
4.2.5.1.	Preparación de diluyentes y medios	42
4.2.5.2.	Recuperación Espermática	44
4.2.5.3.	Agrupaciones (Pool).....	44



4.2.5.4.	Evaluación de la concentración.....	45
4.2.5.5.	Variables de motilidad.....	45
4.2.5.6.	Integridad de membranas espermáticas	46
4.2.5.7.	Análisis morfométrico.....	47
4.2.5.8.	Criopreservación de espermatozoides	47
4.2.5.8.1.	Congelación convencional (CC).....	47
4.2.5.8.2.	Congelación Ultrarrápida (CU)	48
4.2.6.	Análisis estadístico	48
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
5.1.	Variables de cinética espermática:.....	50
5.2.	Integridad de membranas plasmática y acrosomal	56
5.3.	Análisis de morfometría de la cabeza de los espermatozoides	61
6.	CONCLUSIONES.....	63
7.	RECOMENDACIONES	64
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	65
9.	ANEXOS	78



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Testículo con escroto, sin escroto y corte transversal a través de los túbulos seminíferos.....	26
Figura 2. Principales elementos de los espermatozoides de mamíferos.....	27
Figura 3. Evaluación de la integridad de membrana plasmática con fluorescencia.....	37
Figura 4. Análisis espermático de cada espermatozoide; amarillo=acrosoma; azul=resto de la cabeza; verde=parte anterior de la pieza intermedia.....	38
Figura 5. Mapa de Ubicación del área de estudio (Azuay).....	41
Figura 6. Cuadro de diseño experimental.....	44
Figura 7. Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides.....	46
Figura 8. Figura 8. Porcentaje de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	50
Figura 9. Velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP) y velocidad rectilínea (VSL) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	51
Figura 10. Parámetros de relación que expresan rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	52
Figura 11. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de flagelo (BCF) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	53
Figura 12. Estado de las membranas plasmática y acrosomal evaluadas en las diversas subcategorías mediante la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC en muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	58
Figura 13. Integridad de la membrana plasmática y acrosomal de las muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).....	59



Figura 14. Largo, ancho área y perímetro de las muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultrarrápida (CU).....61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diluyente sintético TCG.....43

Tabla 2. Diluyente para Congelación convencional (CC).....43

Tabla 3. Diluyente para Congelación ultrarrápida (CU).....44

Tabla 4. HEPES para fluorescencia.....44

Tabla 5. Yoduro de propidio.....44

Tabla 6. Aglutinina.....44



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valores promedios y variabilidad (promedio \pm error estándar de la media) de los parámetros cinéticos del sistema CASA de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC)) y ultra-rápido (CU).....	78
Anexo 2. Porcentajes de espermatozoides (promedio \pm error estándar de la media) en las diversas categorías de integridad de la membrana (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC)) y ultra-rápido (CU).....	78
Anexo 3. Valores promedio (promedio \pm error estándar de la media) del largo, ancho, área y perímetro de la cabeza de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC)) y ultra-rápido (CU).....	78
Anexo 4. Proceso Quirúrgico para la obtención de testículos con sus epidídimos intactos (ORH).....	79
Anexo 5. Testículos con problemas patológicos descartados.....	79
Anexo 6. Disección del epidídimo con sus tres partes intactas y conducto deferente de 1 cm.....	79
Anexo 7. Técnica de flujo retrogrado para la recuperación de espermatozoides epididimarios.....	79
Anexo 8. Material obtenido después de la realización de la técnica de flujo retrogrado.....	80
Anexo 9. Material espermático obtenido recogido con una pipeta de 1000 ml.....	80
Anexo 10. Preparación del material obtenido para realizar los diferentes procesos de medición.....	80
Anexo 11. Cámara de Neubauer con muestra para medir la concentración espermática.....	80
Anexo 12. Medición de parámetros de Motilidad: Total y Progresiva y Cinética...81	81
Anexo 13. Preparación de muestras con tinción Sperm Blue para evaluar morfometría.....	81



Anexo 14. Cargado de pajuelas para realizar el método de congelación convencional (CC).....	81
Anexo 15. Movimiento de las pajuelas de la primera rampa a la segunda en el procedimiento de la congelación convencional.....	81
Anexo 16. Gotas de 30 μ l de material espermático sumergidas en NL_2 dejando caer desde una altura de 15 cm.....	82
Anexo 17. Pellets formados en la congelación ultrarrápida y colocados en un tubo Falcon de 15 ml.....	82
Anexo 18. Pellets colocados en baño María para su descongelamiento.....	82
Anexo 19. Material obtenido después de la descongelación de los pellets en baño María.....	82
Anexo 20. Limpieza de partículas extrañas de las muestras de Motilidad y Cinética.....	83
Anexo 21. Evaluación de morfometría de las muestras con tinción de Sperm Blue.....	83
Anexo 22. Evaluación de la integridad de membranas en donde se observa IPDA, DPIA, DPDA.....	83



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Blanca Gabriela Landi Loja, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 17 de septiembre de 2021

Blanca Gabriela Landi Loja

C.I: 1450070147



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Edisson Leonardo Mejía Jara, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 17 de septiembre de 2021

Edisson Leonardo Mejía Jara

C.I: 0104083738



Cláusula de Propiedad Intelectual

Blanca Gabriela Landi Loja, autor del trabajo de titulación Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 17 de septiembre de 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'BL' or similar initials, written over a horizontal line.

Blanca Gabriela Landi Loja

C.I: 1450070147



Cláusula de Propiedad Intelectual

Edisson Leonardo Mejía Jara, autor del trabajo de titulación Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 17 de septiembre de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Edisson Leonardo Mejía Jara', written over a horizontal line.

Edisson Leonardo Mejía Jara

C.I: 0104083738



AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Dios por guiarnos paso a paso en nuestro camino de estudio universitario, por darnos la fuerza y perseverancia para seguir adelante y alcanzar una meta más, la cual nos permite desarrollarnos como profesionales en Medicina Veterinaria.

A nuestros familiares y amigos, quienes estuvieron en todo momento apoyándonos moralmente y con sus consejos a lo largo de nuestra trayectoria universitaria.

Al Dr. Diego Andrés Galarza M.V.Z, Mgs, Ph.D., por haber confiado en nosotros, haber dirigido nuestra tesis y apoyarnos en cada momento con sus amplios conocimientos, experiencia y paciencia para la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del tribunal, al Dr. Manuel Soria, al Dr. Guillermo Guevara y a la Dra. Cristina Bernardi, por habernos brindado su tiempo y darnos consejos en la realización de este proyecto de tesis.

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, al Dr. Juan Taboada y todo su equipo de las campañas de esterilización, quienes nos permitieron ser partícipes de las mismas y así poder llevar a cabo nuestra investigación.

Un agradecimiento especial a los Técnicos docentes del laboratorio, Xavier Samaniego y Jonathan Alvarado por el apoyo en el desarrollo de la parte práctica de este proyecto de titulación.

Gabriela & Edison



DEDICATORIA

A Dios todo poderoso mi creador, mi fuente de inspiración y sabiduría a lo largo de toda la vida, gracias por guiarme a tomar las mejores decisiones siempre, las cuales me han formado en la persona que ahora soy.

Un especial sentimiento de gratitud a mi familia, lo más valioso que poseo, por ser mi fuerza y motivo de luchar cada día. Por todo el amor brindado, su enorme apoyo incondicional y comprensión en los últimos años me ha permitido cumplir con todas mis metas y sueños.

Al Dr. Diego Andrés Galarza, por sus invaluable consejos, apoyo continuo y paciencia durante todo este proceso, su inmenso conocimiento y experiencia me han animado en todo el tiempo de investigación a dar todo de mí para terminar este trabajo con mucho éxito.

A mis maestros, que día a día me enseñaron con paciencia y dedicación, sus palabras y enseñanzas resuenan en mis oídos, gracias por proporcionarme las herramientas necesarias para convertirme en una excelente profesional en Medicina Veterinaria.

A mis amigos, por creer en mí, por todo el tiempo de estudio compartido y por enseñarme lo increíble que es la vida de estudiante, me llevo en el corazón los momentos maravillosos que compartimos en las aulas y todas las anécdotas vividas las cuales siempre recordaré.

Gabriela Landi L.



DEDICATORIA TESIS

A mis padres por su apoyo, esfuerzo, perseverancia y amor que me han brindado en todo momento de mi vida, y más en los momentos difíciles. Este logro de mi vida es gracias a ustedes ya que sin su apoyo no lo hubiese podido lograr.

A mi familia en general que confiaron en mí y me brindaron siempre su ayuda para poder seguir adelante.

A Gabriela, quién desde que entre a la Universidad confió en mi desde el primer momento y con la cual hemos compartido muchas anécdotas y logros de nivel académico, gracias por haber aceptado ser mi compañera para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Diego Andrés Galarza por haber confiado en nosotros para que este proyecto de tesis sea excelente dándonos apoyo, comprensión y con palabras motivacionales lo que me ha dado fortaleza para seguir adelante y alcanzar esta meta en mi vida.

Al Dr. Juan Taboada quien, a más de ser mi profesor, fue un gran amigo que me aconsejo siempre a lo largo de toda mi vida Universitaria.

Edisson Mejía J.

**Acrónimos**

Acrónimos	
CU	Congelación ultrarrápida
CC	Congelación convencional
TCG	Tris, ácido cítrico, glucosa
YH	Yema de huevo
PI	Yoduro de propidio
PNA-FITC	Aglutinina
μl	Microlitros
mM	Milimolar
NL2	Nitrógeno líquido
MT	Motilidad total
MP	Motilidad progresiva
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
VAP	Velocidad promedio
LIN	Linealidad
STR	Rectitud
WOB	Oscilación
BCF	Frecuencia del batido del flagelo
ALH	Amplitud del movimiento lateral de la cabeza
IPIA	Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto
IPDA	Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado
DPIA	Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto
DPDA	Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado
IMP	Membrana plasmática intacta
IMA	Membrana acrosomal intacta



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el desarrollo de las biotecnologías reproductivas ha progresado considerablemente permitiendo preservar el material genético (ej. gametos y embriones) de reproductores (machos y hembras) considerados de alto valor genético. La criobiología permite recuperar y preservar espermatozoides de individuos de varias especies, tanto de animales vivos como de animales que han muerto bajo diferentes circunstancias (ej. causas inesperadas). Previo a la criopreservación, los espermatozoides son recuperados de diferentes maneras. La manera más común de recuperar espermatozoides es a través de la vagina artificial y la electroeyaculación aplicada a animales vivos. Como resultado se obtiene eyaculados de semen que incluyen en sus componentes plasma seminal proveniente de las glándulas sexuales masculinas (vesículas seminales, bulbo uretrales y próstata). El plasma seminal desempeña un papel fundamental de protección de espermatozoides contra el choque de frío y choque osmótico. Esto no sucede con los espermatozoides epididimarios recuperados *post-mortem* o después de una orquiectomía (castración quirúrgica) debido a que los espermatozoides provienen de la cola del epidídimo, y entonces, el fluido en el que están inmersos son estrictamente epididimarios (Santiago-Moreno et al., 2020).

En este sentido, los espermatozoides de la cola del epidídimo, al carecer de los componentes del eyaculado seminal, se convierten en células más sensibles al choque de frío (Salamon y Maxwell, 2000) y lesiones criogénicas durante el proceso de congelación y descongelación (Prapaiwan et al., 2016). Por esta razón, se ha sugerido que los espermatozoides de origen epididimario podrían ser más sensibles a la criopreservación en comparación con los espermatozoides provenientes de eyaculados. Sin embargo, la capacidad de los espermatozoides para resistir el daño durante la criopreservación parece residir en las propias células, probablemente, debido a la composición como ha sido evidenciado en espermatozoides de toros y carneros (Graham, 1994). Además, se ha reportado que los espermatozoides del perro responden de manera diferente a la criopreservación en comparación con otras especies de animales debido a las diferencias individuales entre machos y una variabilidad en la tasa de concepción después de la descongelación (Yu et al., 2002). Concomitante a estos efectos, se



ha determinado que incrementa el daño oxidativo después de la descongelación (Lucio et al., 2016). En consecuencia, los actuales protocolos de criopreservación de espermatozoides epididimarios van direccionados a proteger las membranas espermáticas (inmaduro) y mejorar las técnicas de congelación ya que estos son teóricamente más sensibles.

Durante el proceso de criopreservación ocurren cambios estructurales, bioquímicos y funcionales que limitan la supervivencia celular (Maxwell et al., 1993). La supervivencia celular depende, principalmente, del estrés osmótico y deshidratación celular que sufren los espermatozoides durante la congelación y descongelación (Hammerstedt et al., 1990; Mazur, 1984). Además, los espermatozoides pueden ser afectados por los daños mecánicos ocurridos por la producción de cristales de hielo extra e intracelular. Estos cambios provocan la muerte de algunos espermatozoides y graves daños latentes en la población de espermatozoides que sobrevive después de la criopreservación, lo que compromete la vida útil y la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados y descongelados (Watson, 1995).

Holt et al., (2014) sugieren que esos cambios que sufren los espermatozoides durante la criopreservación se atribuyen específicamente a las velocidades de enfriamiento. Otros autores han sugerido que la supervivencia espermática posdescongelación va a depender en gran medida del proceso en sí de congelación que involucra el tipo de diluyente usado, los agentes crioprotectores (penetrantes y no penetrantes) y su exposición, el protocolo de congelación, las velocidades de enfriamiento y el método de descongelación empleada, etc. (Grötter et al., 2019).

Si bien, estos factores descritos anteriormente han sido estudiados minuciosamente, los resultados obtenidos en criosupervivencia de espermatozoides caninos sigue siendo variable con los métodos convencionales de congelación (ej. motilidad y viabilidad entre 20 – 40%) (Yu, 2014). Sin embargo, la criosupervivencia de espermatozoides caninos epididimarios ha mejorado usando diluyentes a base de Tris (ej. motilidad y viabilidad del 40 – 50%) (Mota-Filho et al., 2014; Martins et al., 2012). Varios estudios describen que la membrana plasmática y el acrosoma de espermatozoides caninos son sensibles a los cambios de temperatura y que al tratarse de espermatozoides epididimarios, a diferencia a



un espermatozoides eyaculado, no han interactuado con proteínas del plasma seminal, fluidos vitamínicos, fuentes de energía, azúcares, etc., y estos son más sensibles a sufrir choque de frío (Hewitt et al., 2001). En consecuencia, es necesario buscar nuevas alternativas de criopreservación de espermatozoides caninos que permitan incrementar una mayor criosupervivencia celular.

En este sentido, los nuevos protocolos de congelación de espermatozoides canino buscan disminuir este criodaño mediante el uso de dos o más rampas de enfriamiento. Una primera rampa que proporcione una velocidad inicial lenta (ej. 4 - 5 °C/min) hasta el momento de la nucleación de hielo, seguida por una aceleración con velocidades de enfriamiento más altas tales como 20 °C/min. Esto podría mejorar el nivel de deshidratación celular y lograr un equilibrio osmótico durante el congelamiento como ha sido demostrado por Woelders y Chaveiro (2004). De hecho, se ha evidenciado que el uso de protocolos de congelación que usan velocidades de enfriamiento por aceleración y que incluyen velocidades iniciales lentas producen una mejor motilidad, cinética, integridad de membranas espermáticas (plasmática, acrosomal y mitocondrial) e integridad de ADN (Galarza et al., 2019a; Galarza et al., 2019b).

Otras alternativas de criopreservación son la congelación ultrarrápida (CU) y/o vitrificación (V). Estas biotecnologías reproductivas son consideradas de gran importancia en los recientes avances de la criobiología. Estas técnicas de criopreservación emplean velocidades de enfriamiento muy rápidas que van desde 15 000 hasta 30 000 °C/min, y todo el proceso tarda solo algunos segundos. Si bien la congelación convencional requiere el uso de crioprotectores para prevenir el daño causado por la formación de cristales de hielo, el uso de concentraciones elevadas de crioprotectores no penetrantes (desde 100 mM hasta 6 M) y un enfriamiento rápido permite que las soluciones se enfríen a temperaturas extremadamente bajas sin que se forme hielo en absoluto (Holt et al., 2014). Estudios sugieren que este modo de criopreservación ultrarrápida no forma cristales de hielo y alcanza la transición vítrea más rápido y estable (Restrepo et al., 2009). Para lograr este propósito, tanto la CU o V necesitan agentes crioprotectores no penetrantes como azúcares disacáridos (ej. sacarosa o trehalosa). Este efecto ya ha sido inicialmente demostrado por Caturla-Sánchez et



al. (2018) en la criopreservación de espermatozoides caninos provenientes de eyaculados. Sin embargo, se conocen reportes limitados sobre la congelación ultrarrápida o vitrificación de espermatozoides epididimarios de perros. De hecho, no se ha reportado evidencias sobre estos métodos de criopreservación en espermatozoides caninos de origen epididimario. De todas maneras, los resultados reportados han sido poco deseables (Restrepo et al., 2009). En consecuencia, considerando el éxito de esta técnica en la conservación de espermatozoides humanos, la vitrificación o congelación ultrarrápida podría constituirse en el futuro de la criopreservación del semen canino.

Por lo tanto, la presente investigación pretende demostrar que la técnica de CU puede ser una alternativa útil y prometedora a la congelación con vapores de NL_2 y que podrían incrementar el resultado de la criosupervivencia espermática basada en términos de cinética e integridad de membranas plasmática y acrosomal, y por lo tanto, fertilidad en general como ha sido demostrado previamente por Bunyaga y Kashoma, (2017).



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de caninos sobre las características de motilidad, integridad de las membranas espermáticas y morfometría celular.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características cinéticas de espermatozoides epididimarios recuperados después de 96 h de almacenamiento en refrigeración (5 °C).
- Comparar los métodos de congelación de espermatozoides caninos (convencional y ultrarrápida) mediante el análisis cinético e integridad de membranas espermáticas.
- Evaluar las características morfométricas de los espermatozoides epididimarios antes y después de cada tipo de congelación usando la tinción SpermBlue y sistema ASMA, SCA.



3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

3.1.1. Testículos

Es el principal órgano reproductivo del macho, es encargado de generar hormonas esteroideas y producir los gametos masculinos, los cuales no están presentes desde el nacimiento, es decir, las células germinales masculinas atraviesan divisiones continuas durante toda la vida reproductiva del animal (Alamo Santana, 2007). Los testículos atraviesan el canal inguinal alrededor del cuarto día de vida, localizándose en el interior del escroto entre los 10-14 días después del nacimiento (Allen, 1998).

3.1.2. Cordón espermático

Discurre entre el testículo y la pared abdominal, está formado por el conducto deferente que se encarga del transporte espermático desde el epidídimo hasta la uretra, el músculo cremáster el cual es el encargado de modificar la distancia de los testículos al abdomen produciendo de esta manera la termorregulación, la arteria espermática o testicular que transporta sangre desde la aorta hasta el testículo y la vena espermática o testicular que garantiza el retorno de sangre desde el testículo a la vena cava, permitiendo la reducción de la temperatura de la sangre arterial, evitando así un calentamiento excesivo del testículo (Alamo Santana, 2007).

3.1.3. Epidídimo

Es un tubo sinuoso que conecta los conductos eferentes que salen del testículo con el conducto deferente. Los túbulos seminíferos se unen para formar la rete testis que a su vez da lugar a los conductos eferentes, a una serie de 4 a 20 túbulos, el número depende de la especie. Estos túbulos se unen nuevamente para formar un solo conducto altamente enrollado que es extremadamente largo, teniendo en el perro una longitud de unos 5-8 metros (König y Liebich, 2005; Vieira, 2013).

3.1.4. Estructura del epidídimo

El epidídimo está compuesto por: cabeza, cuerpo y cola.



a. Cabeza

Está fijada por medio del mesoepidídimo, situado en la posición caudal o dorsal con respecto al contorno longitudinal medial del testículo, en medio de esta unión se define la bolsa testicular.

b. Cuerpo

Se extiende a lo largo de la cara caudo-lateral del testículo. En el conducto del epidídimo termina de madurar los espermatozoides que quedan almacenados en su porción terminal, la cola del epidídimo hasta la eyaculación.

c. Cola

Está fijada por ligamentos por una parte al testículo mediante el ligamento propio del testículo, y por otra a la base del proceso vaginal mediante el ligamento de la cola del epidídimo. Después de abandonar la cola del epidídimo el conducto del epidídimo se continua como conducto deferente, en posición medial con respecto al epidídimo (König y Liebich, 2005).

3.1.5. Espermatozoides epididimarios

La criopreservación de los espermatozoides epididimarios caudales es una técnica eficaz para conservar el potencial genético de los perros superiores cuando no es posible recolectar espermatozoides eyaculados (Prapaiwan et al., 2016). A diferencia de los espermatozoides del eyaculado, los del epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal que pudieran modificar las características estructurales de la membrana plasmática, confiriendo cierta ventaja en relación al tiempo necesario para alcanzar la capacitación (Ávalos et al., 2013).

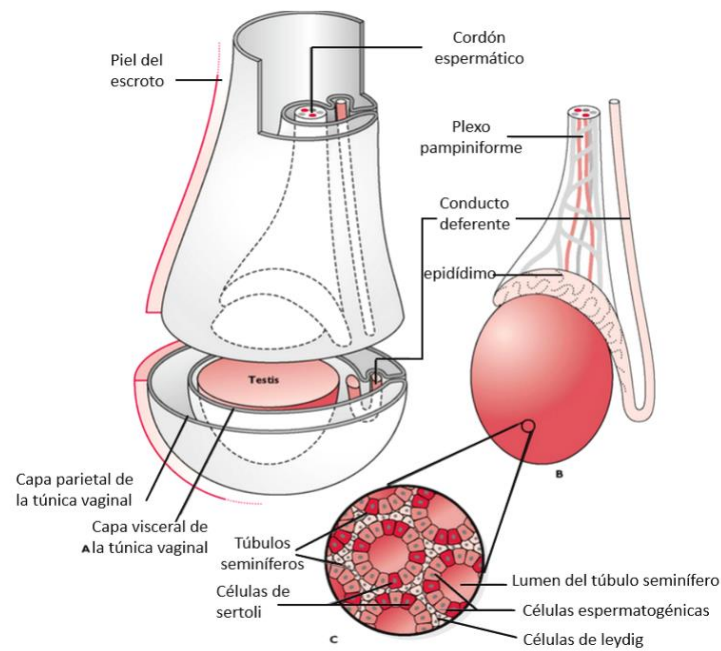


Fig.1. (A) testículo con escroto y (B) sin escroto, (C) corte transversal a través de los túbulos seminíferos (VeterinarianKey, 2016).

3.2. FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA

3.2.1. Maduración

Se adquiere durante el tránsito por el epidídimo, una vez transportados en el epidídimo y transitan a través de la cabeza y cuerpo hasta llegar a la cola se consideran igualmente maduros que los eyaculados y son potencialmente fértiles; la capacitación y reacción acrosomal ocurre después de que el espermatozoide ha sido eyaculado dentro del aparato reproductor de la hembra y es transportado hacia el oviducto (Ávalos et al., 2013).

Dentro del epidídimo se produce la maduración morfológica y funcional de los espermatozoides; la maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento se da en la cola (Armas, et al., 2011).

Los cambios funcionales del espermatozoide se dan progresivamente, la capacidad de motilidad que se adquiere gradualmente desde la cabeza hasta la cola con modificaciones cuantitativas y cualitativas de sus patrones que va desde una leve contracción del flagelo a un movimiento progresivo y vigoroso hacia adelante (Varesi et al., 2013).

Los cambios estructurales durante el tránsito epididimario incluyen alteraciones en la forma de la cabeza debido a una reducción en el tamaño del capuchón acrosómico y la pérdida de gotas citoplasmáticas unidas a la pieza media (Hewitt et al., 2001). Las gotas citoplasmáticas se desarrollan durante la espermatogénesis normal y representa un residuo del citoplasma después de que las células de Sertoli han fagocitado la mayor parte del citoplasma espermático (Cooper, 2011).

3.2.2. Capacitación

Se da mientras los espermatozoides avanzan por la región caudal del istmo del oviducto, únicamente los espermatozoides que poseen un acrosoma reactivo podrán capacitarse (Alamo-Santana, 2007).

3.2.3. Reacción acrosomal

Es un indicador de la culminación del proceso de capacitación, ocurre en las cercanías o en contacto con las cubiertas del ovocito y en espermatozoides de perros se ha observado que tanto los que han reaccionado como los que no, serían capaces de unirse a la zona pelúcida de ovocitos caninos (Rodríguez, 2009).

3.3. ESTRUCTURA ESPERMÁTICA

La estructura básica del espermatozoide consta de partes claramente diferenciadas que son la cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide (que se divide en intermedia, pieza principal, pieza terminal y el axonema) (Ochoa y Torres, 2012).

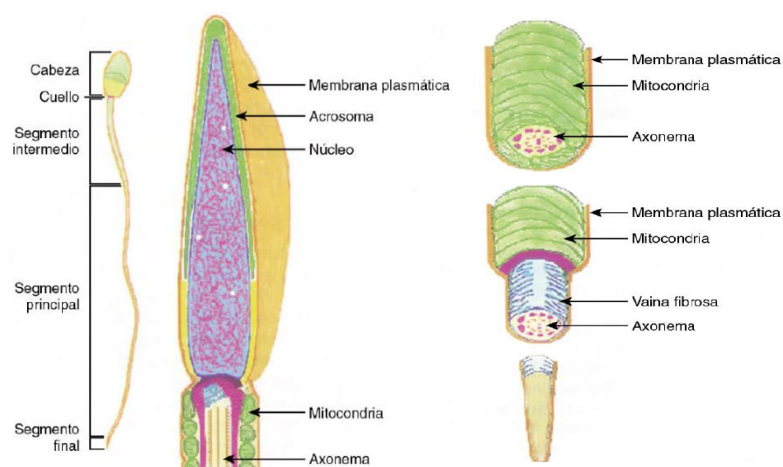


Fig.2. Principales elementos de los espermatozoides de mamíferos (Meistrich, 2010).



El volumen del eyaculado es de 1-40 ml la concentración de espermatozoides en un macho adulto es de 200-1000 millones/ml, siendo las razas grandes en las cuales se encuentra mayor cantidad, la motilidad progresiva es de alrededor 75-80% y el pH varía entre 6,3-6,7 dependiendo de la cantidad de líquido prostático obtenido en la colecta (Armas et al., 2011).

3.3.1. Cabeza

Tiene una longitud de $6.1 \pm 4 \mu\text{m}$ y ancho de $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$. La pieza intermedia es recta y de contorno regular, se halla alineada con el eje longitudinal de la cabeza y mide $10.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de longitud. La cola es única, delgada no enrollada y de contorno irregular, tiene una longitud de $50 \mu\text{m}$ (Woodall y Johnstone, 1988).

La cabeza posee un núcleo aplanado oval que contiene cromatina muy compacta, la cromatina condensada contiene el ADN y contiene un número cromosómico haploide, el acrosoma es una estructura que contiene acrosina, hialuronidasa y enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de fecundación (Armas et al., 2011).

3.3.2. Pieza media

Formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice, garantizando el metabolismo y la motilidad del espermatozoide (Alamo-Santana, 2007).

3.3.3. Cola espermática

Por su movimiento flagelar permite el movimiento del espermatozoide (Hewitt et al., 2001). De la Proción terminal de la pieza intermedia parten una serie de fibrillas hacia la cola, presentando dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, las cuales son responsables del movimiento del espermatozoide (Alamo-Santana, 2007; Frandson y Spurgeon, 1995).

3.3.4. Vaina mitocondrial

Proporciona energía necesaria para el desplazamiento hacia delante y atrás de los microtúbulos del interior de la cola produciéndose la motilidad espermática, la



membrana plasmática que cubre la célula espermática posee forma de una bicapa lipídica con fosfolípidos y proteínas asociadas (Armas et al., 2011).

3.3.5. Membrana del espermatozoide

La composición de la membrana es de especial interés por su papel en la fecundación, así como por los cambios físicos que sufre durante la refrigeración y la criopreservación y que determina su viabilidad. (Parks y Lynch, 1992) La membrana plasmática es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, el segmento ecuatorial y basal, la pieza intermedia y la cola. Las diferencias en la composición de la membrana en estas regiones están relacionadas con sus funciones fisiológicas (Ladha, 1998).

3.3.5.1. Composición lipídica

Varía entre especies, pero por lo general la membrana plasmática contiene aproximadamente un 70% de fosfolípidos (alrededor del 50% son parte de la membrana del espermatozoide), 25% de lípidos neutros y 5% de glicolípidos (Macías-García et al., 2011).

a. Fosfolípidos

Participan en el aporte energético durante la proliferación y maduración espermática, además la relación que tiene con el colesterol posee un papel importante sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides (Brinsko, Crockett, y Squires, 2000; Selvaraj et al., 1987).

b. Colesterol

Proporciona estabilidad a la estructura de los ácidos grasos en amplios rangos de temperatura bloqueando los grandes movimientos de los mismos, a bajas temperaturas previene la compactación de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos impidiendo que las colas de los espermatozoides se junten (Vieira, 2013).

c. Lípidos neutros

Podemos encontrar grandes diferencias entre especies, interespecies y entre eyaculados del mismo animal (Macías-García et al., 2011).

d. Glicolípidos

Se encuentran tanto en la membrana de la cabeza como en la cola de los espermatozoides y están relacionados con la capacitación espermática y la interacción con la zona pelúcida (Vieira, 2013).



3.3.5.2. Composición proteica

Las proteínas que son elaboradas en el tejido testicular se reabsorben en la primera región del epidídimo, por lo cual los cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides están directamente relacionados con la actividad secretora del epitelio epididimario (Gatti et al., 2000). También el epitelio epididimario produce pequeñas moléculas de azúcares libres y electrolitos, macromoléculas como proteínas y glicoproteínas que proporcionan un medio adecuado para la maduración de los espermatozoides (Vieira, 2013).

3.4. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS CANINOS

Existen varios métodos para la obtención de espermatozoides de esta región entre los que se encuentran la técnica de flotación mediante cortes realizados en el epidídimo, el lavado retrogrado del epidídimo con un medio líquido y la aspiración. La técnica de flotación consiste en colocar el epidídimo en un medio de cultivo y hacer cortes en la pared de la cola del epidídimo mediante el uso de un bisturí. La técnica de lavado retrogrado consiste en inyectar el medio con una jeringa a través del vaso deferente y ejercer presión hasta obtener los espermatozoides (Cary et al., 2004).

3.5. RECOLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN

Antes de la recolección de semen, debe obtenerse una revisión histórica exhaustiva y completa de las experiencias previas de salud y reproducción del perro. Además, información sobre la medicación durante los últimos 6 meses (como mínimo) y sobre los antecedentes genéticos o familiares también son importantes (Johnson, 2006). También debe recopilarse información sobre el estado de las vacunas, las desparasitaciones (Ettinger y Feldman, 2010).

3.6. CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación del semen es un método práctico para almacenar células de esperma y luego mejorar el gen y para amplificar los caracteres reproductivos y productivos elegidos (Amini et al., 2019). La criopreservación es un proceso donde las células o los tejidos se conservan enfriando a temperaturas bajo cero como -



196°C. El proceso por lo general implica agregar crioprotectores, posterior congelación, almacenamiento y descongelamiento (Bunyaga y Kashoma, 2017).

3.6.1. Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación del semen canino facilita el intercambio de genes de valiosos machos durante un tiempo prolongado, los espermatozoides del perro responden de manera diferente a la criopreservación en comparación con otras especies animales. Esto normalmente, se asocia con altas diferencias individuales y una tasa de concepción pobre después de la descongelación (Yu et al., 2002).

3.6.2. Principios de la Criopreservación

En los principios de la criopreservación, la velocidad de enfriamiento es muy importante, ya que cuando es lenta, la mayoría de los espermatozoides funcionarán después de la descongelación; sin embargo, la criopreservación tiene efectos negativos sobre la viabilidad de los espermatozoides, lo que podría estar relacionado con lesiones de la membrana plasmática, disminuyendo así la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Bilodeau et al., 2000; Cerolini et al., 2001).

Durante el proceso de criopreservación diferentes factores estresantes como la presión osmótica, tensiones fisicoquímicas y las fluctuaciones de temperatura de congelación-descongelación generan oxígeno reactivo (ROS) y también peroxidación lipídica (LPO) de la membrana celular reduciendo las características cualitativas del semen, como la viabilidad, motilidad e integridad de la membrana plasmática (Amini et al., 2019).

Los principales factores que influyen en la supervivencia de los espermatozoides criopreservados son: las propiedades osmóticas de los gametos, las tasas de enfriamiento y calentamiento y la formación de cristales de hielo intracelulares (Stănescu y Birtoiu, 2012). Los espermatozoides caninos tienen una gran respuesta al desafío osmótico, siendo la capacidad de regular el volumen celular fundamental para la criosupervivencia celular (Petrunkina et al., 2005).

3.6.3. Diluyentes

Durante mucho tiempo, los diluyentes de semen estándar utilizados en perros se hicieron con yema de huevo. Sin embargo, la yema de huevo presenta numerosas



desventajas. Está asociado con un riesgo para la salud ya que es un excelente medio de cultivo microbiano y puede promover la aparición de infección uterina después de la inseminación de la perra (Bunyaga y Kashoma, 2017).

La yema de huevo protege las membranas celulares contra el choque frío y previene o restaura la pérdida de fosfolípidos de la membrana, esta, no es una entidad definida, sino un compuesto biológico complejo que contiene proteínas, vitaminas, fosfolípidos, glucosa y antioxidantes que son potencialmente útiles para la integridad de la membrana celular (Farstad, 2009).

Actualmente, los extensores de Tris se usan comúnmente y se encuentran efectivamente en el semen del perro (Martins et al., 2012). Sin embargo, algunos investigadores sugieren que el extensor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al 6% es el mejor. Mientras que otros estudios muestran que equex y los extensores de LDL al 6% tienen más éxito. Los estudios sobre extensores siguen siendo controvertidos ya que la mayoría de los extensores presentan algunas características individuales interesantes que no se encuentran en los demás (Bencharif et al., 2012).

3.6.4. Crioprotectores

Los crioprotectores del semen mejoran la supervivencia celular después del proceso de congelación. Los crioprotectores se dividen en dos grupos. Primero están los agentes crioprotectores intracelulares como el glicerol y el dimetilsulfóxido. En segundo lugar, están los extracelulares, como las proteínas y los azúcares. El glicerol es el crioprotector utilizado a menudo para congelar semen de diferentes especies (Silva et al., 2003).

Como un crioprotector permeable, el glicerol evita la formación de cristales de hielo dentro de las células. Sin embargo, se ha informado que el glicerol tiene efectos tóxicos sobre los espermatozoides, tales como alteraciones fisicoquímicas que pueden conducir a la ruptura de la membrana plasmática o la eliminación de proteínas de membrana importantes, y causar daño acrosómico, que se reflejará en una fertilidad reducida (Holt, 2000).

3.6.5. Congelación convencional

La congelación en vapores de nitrógeno líquido cuando alcanza temperaturas entre -5 y -10 °C forma núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio



extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Boiso, 2001). La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Holt, 2000). Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula. Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Ramónez, 2013).

3.6.6. Vitrificación y congelación ultrarrápida

La vitrificación es una técnica simple y de bajo costo, además, requiere menos tiempo que los protocolos de congelación convencionales y parece adecuada para su uso rutinario en la clínica veterinaria (Sánchez et al., 2011). Permite la protección de los espermatozoides al aumentar la viscosidad de los fluidos intra y extracelulares y, por lo tanto, evita la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos, que pueden minimizar las alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática (Marais, Du Plessis, y Huyser, 2014).

Tradicionalmente, la vitrificación se ha utilizado para el almacenamiento de embriones. Sin embargo, recientemente se ha realizado vitrificación en espermatozoides de diferentes especies, incluidos perros, peces y muflón. El único estudio encontrado sobre la vitrificación de esperma de perro ha utilizado sacarosa, un disacárido de glucosa-fructosa, como crioprotector no permeable (Caturla Sánchez et al., 2017).

Esta técnica requiere el contacto directo con NL_2 durante un tiempo determinado, en el interior de los vapores de nitrógeno existe un gradiente térmico en función de la distancia y el volumen de líquido que se encuentra debajo (Di Santo, Tarozzi, Nadalini, & Borini, 2012), debido a esto, una de las principales características de CU es que cambia rápidamente sus rangos de temperatura (entre 20 y 5 °C), a los que la membrana de los espermatozoides caninos son particularmente sensibles, lo cual se asocia más a la concentración que al tipo de disacárido utilizado. Se ha



descrito que los principales cambios atenuados por la vitrificación por congelación y descongelación han sido acrosómicos (Caturla Sánchez et al., 2017).

Una de las ventajas de la CU sobre la CC es su simplicidad y tiempo requerido para realizarla, ya que, se necesita alrededor de 30 minutos para realizar todo el procedimiento (Bóveda et al., 2018). La clave al momento de utilizar esta técnica con esperma de diferentes especies es agregar un crioprotector no penetrante al diluyente y utilizar velocidades de descongelación rápida (Pradiee et al., 2016b).

La adición de crioprotectores no permeables como la albúmina y osmoprotectores no penetrantes como los disacáridos en la CU mejora la criosupervivencia de espermatozoides, especialmente los de la especie canina (Sanchez et al., 2011), ya que, al ser moléculas grandes, deshidrata la célula y disminuye la cantidad de agua intracelular disminuyendo así la formación de hielo (Schuster et al. , 2003).

Estas grandes macromoléculas no pueden atravesar la membrana celular y cuya acción crioprotectora parece estar provocada por deshidratación celular, depresión del punto de congelación y aumento de la viscosidad del medio a bajas temperaturas, inhibiendo así la formación de cristales de hielo. Estas acciones se combinan para proteger la estructura de la membrana plasmática celular y tienen mucho en común con los métodos de conservación celular in vivo evolucionados naturalmente que se basan en la desecación y la biosíntesis de compuestos protectores, típicamente azúcares como la trehalosa (Holt y Penfoldt, 2014).

Debido a la baja tolerancia a los crioprotectores permeables por parte de ciertas especies se ha planteado el uso de nuevas alternativas basadas en la adición de 100 mM de disacáridos como la sacarosa, lo cual ha mostrado tener mayor efectividad (Pradiee et al., 2016b), ya que puede preservar parámetros fisiológicos importantes como el potencial de membrana mitocondrial y la integridad del ADN durante la CU (Gharajelar et al. , 2016)

3.7. Evaluación de calidad espermática por el sistema CASA

El sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*), con el software SCA (Sperm Class Analyzer, SCA® 1999, v.6.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España) permite realizar el análisis de esperma asistido por computadora, lo cual la convierte en una técnica objetiva y precisa (Boryshpolets et al., 2013), además



que se obtendrá resultados lineales y con menos variación analítica que los métodos manuales (Dearing et al., 2014).

El sistema está integrado por los siguientes componentes:

1. Hardware: ordenador y cámara digital de alta resolución con velocidad de captura de 60 imágenes por segundo (Abarca y Madrigal, 2018), microscopio Nikon B-200 con platina termostática y placa calefactora Omron (Aulesa et al., 2009).
2. Software: SCA es un programa informático que permite la agrupación de espermatozoides individuales en función de uno o más atributos para que los resultados reflejen subpoblaciones o grupos de espermatozoides similares con propiedades únicas (Amann y Waberski, 2014), está compuesto por:
 - Módulo de movilidad y concentración: permite analizar la movilidad y concentración espermática, necesita un microscopio que incorpore una platina termostaticada a 37°C para efectuar las mediciones.
 - Módulo de morfología: analiza la morfología y morfometría de los espermatozoides.
 - Otros módulos: módulo de control de base e informes, de fragmentación de ADN y módulo contador (Aulesa et al., 2009).

3.7.1. Análisis de concentración y motilidad

El análisis se realiza tomando 1-5 uL de semen, las cuales deben estar atemperadas previamente a 37°C en placa calefactora (Aulesa et al., 2009).

- **Concentración:** al momento de realizar el análisis el usuario puede visualizar la imagen y capturar hasta 10 campos y un número ilimitado de espermatozoides, con un mínimo de 200-300 espermatozoides (Aulesa et al., 2009).
- **Motilidad:** Este sistema permite reducir la subjetividad de la evaluación de la motilidad de los espermatozoides (Yániz et al., 2018), el movimiento de cada uno de ellos es registrado como cambios en la ubicación del centroide en cuadros sucesivos y los cálculos proporcionan la obtención de parámetros morfocinéticos tales como VCL (velocidad curvilínea de los espermatozoides), VSL (velocidad rectilínea de los espermatozoides), VAP

(velocidad media de los espermatozoides), STR (índice de rectitud de los espermatozoides), LIN (índice de linealidad de los espermatozoides), WOB (índice de oscilación de los espermatozoides), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides), y BCF (frecuencia del cruce de los espermatozoides) (Amann y Waberski, 2014). Según el grado de motilidad, los espermatozoides captarán diferentes colores, donde el color amarillo indica los espermatozoides inmóviles, el color rojo el movimiento progresivo y el color azul el movimiento no progresivo (Castro y González, 2017).

3.7.2. Integridad de la Membrana Plasmática

La fluorescencia se observa con lente de 40x, los espermatozoides vivos no se visualizan con la fluorescencia, el yoduro de propidio (PI) emite fluorescencia verde cuando los espermatozoides tienen el acrosoma dañado, se tiñen de rojo cuando la membrana plasmática está dañada y se tiñen de rojo y verde cuando la membrana plasmática y el acrosoma están dañados (fig.3).

La tinción que estima el porcentaje de células viables, se basa en la capacidad de la membrana plasmática de los espermatozoides para evitar la entrada de colorantes en caso de no estar dañada, por lo cual, es un indicador de la integridad de la membrana plasmática (Abarca y Madrigal, 2018)



Fig 3. Evaluación de la integridad de membrana plasmática con fluorescencia realizada con yoduro de propidio (Fuente: Los autores).

3.7.3. Análisis de morfometría

Para la evaluación de la morfometría, el CASA permite diferenciar dentro de las anomalías, las de la cabeza y cuello (figura 4), permitiendo tener resultados

andrológicos más precisos (Mater, 2019b). El CASA estima parámetros de porcentajes de espermatozoides normales también presenta el cálculo automatizado de los parámetros morfológicos, índice de teratozoospermia y presenta valores morfométricos medios de los espermatozoides evaluados (longitud, anchura, tamaño del acrosoma y ángulo de inserción medio de la cola) (Aulesa et al., 2009).

La mayoría de los estudios publicados sobre la morfometría de los espermatozoides se han centrado principalmente en la cabeza del esperma, aunque pocos otros también han medido otras partes de la estructura de la célula espermática, como el núcleo, el acrosoma, la pieza intermedia o el flagelo completo (cola, incluida la pieza intermedia) (Yániz et al., 2015). Se han utilizado diferentes parámetros para describir la morfometría de la cabeza de los espermatozoides, pero los más comúnmente aceptados son: parámetros primarios que proporcionan información sobre las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides y generalmente incluyen longitud (L , μm), ancho (W , μm), área (A , μm^2) y perímetro (P , μm). (Sánchez et al., 2013)

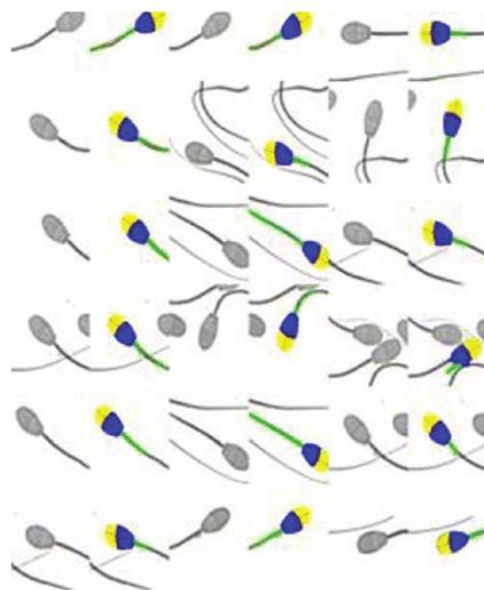


Figura 4: Análisis espermático de cada espermatozoide; amarillo=acrosoma; azul=resto de la cabeza; verde=parte anterior de la pieza intermedia (Mortimer et al., 2015).

Los resultados morfométricos pueden verse influenciados por factores internos y externos en los animales. Los factores intrínsecos incluyen factores genéticos o



ambientales, edad, madurez sexual y frecuencia de muestreo (Valverde et al., 2016). Sin embargo, el factor más importante es la introducción de artefactos como consecuencia de la técnica de tinción. De lejos, este proceso implica la deshidratación de las células, lo que introduce un cambio sensible en la morfología final observada (Yániz et al., 2015).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales Físicos

- Guantes de inspección
- Mascarillas
- Nevera
- Papel secante
- Jeringas 1 ml
- Hojas de bisturí No. 15.
- Pajuelas de 0,25 ml
- Fundas Ziploc
- Caja poliestireno de 29 x 31 x 30 cm (largo, ancho y alto)
- Rampa de enfriamiento doble (de 24 y 10 cm de altura).

4.1.2. Materiales Biológicos

- Testículos de perros con epidídimo y porción inicial de conducto deferente intactos
- Espermatozoides

4.1.3. Materiales Químicos

- Tris (Sigma, 252859)
- Ácido cítrico (Sigma, C0759)
- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicilin G-sodium salt (Sigma, P3032)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma G9012),
- Sacarosa (Sigma, S1888)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutunina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Bovine serum albumin, BSA (Sigma, A9418)



- Tinción Sperm-Blue® (SB-250-N)
- Nitrógeno Líquido

4.1.4. Materiales de Laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas de 0 – 20 μ l, 20 – 200 μ l y de 200 – 1000 μ l
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Centrífuga
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, version 6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast)
- Cajas cuadrículadas para búsqueda
- Refrigerador
- Porta agujas
- Cubre objetos cortos
- Cubre objetos largos
- Termómetro para pajuelas
- Baño María
- Pinzas
- Guantes de nitrilo
- Tubos Falcón de 15 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml

4.2. Métodos

4.2.1. El área de estudio



Fig.5. Mapa de Ubicación del área de estudio (Azuay) (Directorio cartográfico de Google Maps, 2020).

4.2.2. Ubicación política-geográfica

La obtención del material biológico como los testículos con sus epidídimos íntegros fueron recolectados de las campañas de esterilización realizadas por la Clínica Veterinaria Docente de Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en diferentes sectores de la ciudad, y de campañas de esterilización de Clínicas Veterinarias Particulares y/o independientes de la ciudad de Cuenca. Posteriormente, el trabajo experimental sobre la recuperación de espermatozoides, procesamiento, congelación, descongelación y análisis espermático fue realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca situado en la Granja Irquis ($3^{\circ}04'48.1''S$ $79^{\circ}04'31.0''W$, altitud 2.648 metros sobre el nivel del mar).

4.2.3. Unidad experimental y diseño experimental

El experimento incluyó 20 pools (agrupaciones), conformados cada uno por 3 epidídimos seleccionados al azar, procedentes de 30 perros machos adultos (60 epidídimos) orquiectomizados en las campañas de esterilización. Cada pool fue considerado como una unidad experimental. Una evaluación inicial de la calidad espermática fue realizada a cada pool, y posteriormente se dividió en 2 alícuotas

que fueron diluidas y procesadas con el diluyente a base de TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa + 20% de yema de huevo) + 5% glicerol (v/v) y con TCG -YH + 250 mM sacarosa (p/v). Cada alícuota fue sometida a dos procesos de congelación con vapores de NL_2 , con dos rampas de congelación y con congelación ultrarrápida, respectivamente. El análisis de la cinética espermática, integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosomal y morfometría de la cabeza de los espermatozoides fueron realizados antes de la congelación y después de cada método de criopreservación (Fig. 5).

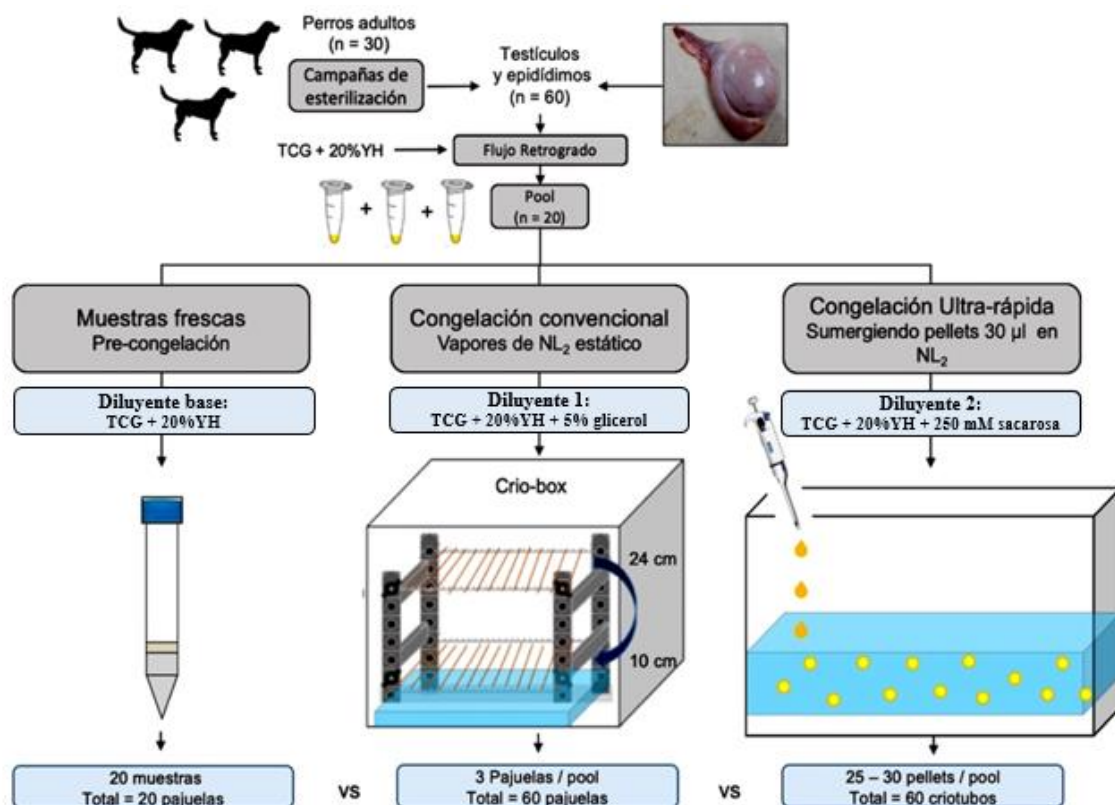


Fig.6. Cuadro de diseño experimental (Fuente: Los autores).

4.2.4. Metodología para la Investigación

Todos los diluyentes y medios usados en la presente investigación fueron elaborados en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Los productos químicos de grado reactivos usados para la elaboración de medios fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co.

Los testículos y sus epidídimos intactos que se usaron en esta investigación fueron incluidos de aquellos animales siguiendo los criterios de inclusión y exclusión que se detallan a continuación:



Criterios de inclusión experimento:

- Perros adultos (mayores de 1 año)
- Perros sanos sin registro de problemas relacionados con salud reproductiva
- Con madurez sexual desarrollada.
- Condición corporal entre 2,5 y 4 según la escala de 1 – 5 (siendo 1 flacura extrema y 5 obesidad extrema) (Baldwin et al., 2010; Dorsten y Cooper, 2004).

Criterios de exclusión experimento:

- Perros con problemas anatómicos.
- Perros con problemas virales, infecciosos.

Además, los testículos que por alguna razón presentaban un daño (ej. cortes, hematomas, o laceraciones) en alguna estructura del epidídimo fueron descartados inicialmente.

4.2.5. Desarrollo de la investigación:

4.2.5.1. Preparación de diluyentes y medios

El diluyente que se usó en este experimento es a base de TCG-YH, y a partir de este se prepararon los diluyentes que se utilizaron para realizar la congelación convencional y ultrarrápida; además, de la preparación de los diluyentes para la evaluación de la integridad de membranas; todos estos se detallan en las siguientes tablas:

Tabla 1. Diluyente de base sintética TCG

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomicina	300 mg
Agua milli-Q	300 ml

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

**Tabla 2.** Diluyente para congelación convencional (CC)

Fracción 1: TCG-YH	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ml
Yema de huevo inactivada a 56° por 30 min.	20 ml (v/v)
<i>*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet</i>	
Fracción 2: TCG-YH+Gly	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	90 ml
Glicerol	10 ml (al 10% v/v)

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

Tabla 3. Diluyente para Congelación Ultrarrápida

Fracción 1: TCG-YH	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ml
Yema de huevo inactivada a 56° por 30 min.	20 ml (v/v)
<i>*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet</i>	
Fracción 2: TCG-YH+Sucrose	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	100 ml
Sacarosa (MW:342,3 g/mol)	250 mM= 8,557 g

Tabla 4. HEPES para fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes sodium salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua milli Q	100 ml

Alicuotar en dosis 250 µl en tubos eppendorf de 1,5 ml y congelar a -20 °C hasta su uso

Tabla 5. Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio (PI, Sigma P-4170)	1 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50 µl

**Tabla 6.** Aglutinina

Reactivo	Cantidad
Fluorescein isothiocyanate-con- jugated peanut (<i>Arachis hypogaea</i>) agglutinin (PNA-FITC, Sigma L7381)	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50 μ l

4.2.5.2. Recuperación Espermática

Los testículos fueron recolectados por orquiectomía sin las tunicas vaginal y albugínea y con el conducto deferente en su porción proximal de aproximadamente 1 cm. Los testículos fueron almacenados en bolsas plásticas estériles “ziploc” con Ringer Lactato en su interior (a temperatura ambiente). Estas bolsas con testículos fueron selladas, identificadas (especificando si es derecho o izquierdo) y almacenadas en una caja de poliestireno con hielo a una temperatura de 4 – 5 °C durante 96 horas.

En el laboratorio, los testículos fueron lavados con solución fisiológica enfriada a 5 °C y el proceso de recuperación espermática se hizo bajo condiciones de refrigeración (entre 5 – 10 °C) usando una aguja metálica No. 20 X 1 ½' cortada en su extremo punzante. La recuperación de espermatozoides epididimarios se realizó mediante flujo retrógrado que consistió en introducir la dicha aguja a través del conducto deferente y administrar 1 ml del diluyente TCG-YH (Fracción 1, Tabla 2 - 3) previamente refrigerado. Al aumentar la presión en la cola del epidídimo, se realizaron varios de cortes transversales y el líquido lechoso obtenido fue recogido en una caja de búsqueda estéril y fría. Inmediatamente, este contenido líquido fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml y almacenado en refrigeración hasta su procesamiento.

4.2.5.3. Agrupaciones (Pools)

Las muestras recuperadas de cada epidídimo izquierdo y derecho fueron analizadas mediante una observación directa y subjetiva de la motilidad y score (1 a 5, considerando 1 como una trayectoria con progresividad mala y 5 trayectoria con progresividad alta). En consecuencia, se formaron pools mediante la agrupación al azar de 3 muestras de epidídimos (izquierdo o derecho,

independientemente) en un tubo Falcon de 15 ml y se mantuvieron a temperatura de refrigeración.

4.2.5.4. Evaluación de la concentración

En cada pool se evaluó el volumen y concentración. El volumen fue medido directamente con la pipeta de 1000 μl , y la concentración fue evaluada mediante un conteo celular usando la cámara de Neubauer. Pevio al conteo celular, se preparó una dilución inicial de 1:200 donde se mezcló 3 μl de muestra de pool analizar con 600 μl de solución formolada (5%). De esa mezcla, se tomó 10 μl (previamente homogeneizada) y aplicamos directamente al lado de la cámara de Neubauer. El conteo lo realizamos en un microscopio de campo claro a una magnificación 40 X en forma de “L” tomando en referencia los cuadrantes de los extremos y el central. El total de células contadas en los cinco cuadrantes lo multiplicamos por 10^7 y el resultado lo expresamos en millones ($\times 10^6$) (Ver Fig. 7).

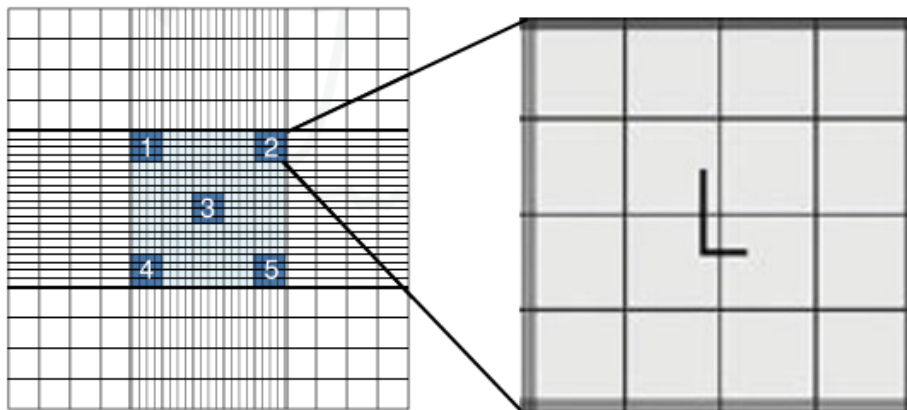


Fig.7. Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides (Montoya, 2009).

4.2.5.5. Variables de motilidad

Las características cinéticas de espermatozoides epididimarios frescos y congelados–descongelados fueron analizados mediante un sistema computarizado CASA (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, versión 6.0.4 software, Microptic S.I., Barcelona, Spain) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a detallado por Galarza et al. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10 X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen



25 cuadros/s). Las muestras que se usaron para evaluar la cinética fueron ajustadas a una dilución de $15 - 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml usando el diluyente TCG-YH.

Una gota de 5 μ l fue colocada en un portaobjetos y entonces cubierta con un cubreobjetos, ambos atemperados a 37 °C. El sistema CASA registró las siguientes variables cinéticas: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad promedio (VAP, μ m/s), porcentaje de linealidad (LIN), porcentaje de rectitud (STR), porcentaje de oscilación (WOB), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m).

4.2.5.6. Integridad de membranas espermáticas

Para la evaluación de las membranas se usó el medio Hepes (250 μ l). Se preparó la tinción de fluorescencia mezclando una dosis (50 μ l) de yoduro de propidio (PI) más una dosis de PNA-FITC aglutinina (50 μ l) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta su uso. Una alícuota de 250 μ l de Hepes descongelado y atemperado a 22°C (temperatura ambiente) se le adicionó a la muestra de espermatozoides a analizar de tal modo que se ajuste a una concentración de 10×10^6 espermatozoides/ml. Sin luz, se agregaron 5 μ l de la mezcla de fluorescencia (PI / PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 μ l de esa mezcla y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia según lo detallado por Galarza et al. (2018). El estado de las membranas plasmática y acrosomal fueron analizados mediante microscopía de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU. excitación: 450 nm, emisión: 490 nm) contando 200 células y expresándose en porcentaje. La prueba de doble fluorescencia simultánea PI / FITC-PNA proporcionó cuatro subcategorías: porcentajes de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA); y con membrana plasmática dañada y membranas acrosómicas dañadas (DPDA). Además, el porcentaje total de células que presentaron una membrana plasmática intacta (IMP,= IPIA + IPDA, equivalente a viabilidad), y una membrana acrosomal intacto (IMA= IPIA + DPIA) fueron registrados.



4.2.5.7. Análisis morfométrico

La morfometría de la cabeza espermática que incluye largo, ancho, perímetro y área, y fue evaluada mediante el sistema CASA (módulo de morfometría ASMA) únicamente en las muestras antes y después de la criopreservación de cada método. Para este propósito se hizo un frotis de cada muestra usando un portaobjetos y colocando 5 μ l de la muestra a analizar y se dejó secar el frotis en la placa térmica a 37°C. Luego, los frotis se sumergieron en la tinción SpermBlue® durante 10 minutos y entonces fueron escurridos durante 1 minuto. Las muestras fueron lavadas en agua destilada sumergiéndolas rápidamente durante 1 segundo una sola vez. Finalmente, las muestras se secaron y se montaron usando el pegamento *mounting medium* y un cubreobjetos largo. Se evaluó en el sistema CASA usando la luz azul, el contraste de fases “A” a 60X de magnificación y registrando 100 espermatozoides por muestra.

4.2.5.8. Criopreservación de espermatozoides

Cada pool diluido y refrigerado fue dividido en 2 alícuotas para ser congeladas usando el protocolo de congelación con vapores de NL_2 o congelación ultrarrápida, respectivamente.

4.2.5.8.1. Congelación convencional (CC)

La primera alícuota de semen diluido con TCG-YH (a temperatura de refrigeración) fue ajustada a un volumen de 1 ml a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente, estas muestras fueron enfriadas a 5 °C y mantenidas durante 1 hora. A partir de entonces, se agregó 1 ml de la Fracción 2 que contiene TCG-YH+Gly (10% glicerol) para alcanzar una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml con un 5% de glicerol y se dejó en equilibrio durante 1 hora más. Previo a la congelación, las muestras se cargaron en pajuelas de 0,25 ml previamente enfriadas y rotuladas. Las pajuelas fueron selladas con alcohol de polivinilo en su extremo posterior dejando una burbuja de aire de aproximadamente 20 μ l para evitar la explosión durante la congelación. Las pajuelas fueron expuestas a vapores de NL_2 contenido en una caja de poliestireno de 29 x 31 x 30 cm (largo, ancho y alto, respectivamente). Inicialmente las pajuelas fueron colocadas en la



rampa superior situada a 24 cm del nivel de NL_2 y se mantuvo durante 1 minuto; por consiguiente, las pajuelas fueron bajadas a la rampa inferior situada a 10 cm del nivel de NL_2 y se mantuvo también durante 1 minuto. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el NL_2 y se almacenaron a $-196\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su descongelación y análisis posterior. La descongelación de las pajuelas fue realizada sumergiéndolas en agua atemperada a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño María durante 30 segundos.

4.2.5.8.2. Congelación Ultrarrápida (CU)

La segunda alícuota de semen diluido con TCG-YH y refrigerado fue diluido con el diluyente 2, TCG-YH+sucrosa (250mM sacarosa) y ajustado a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Estas muestras fueron mantenidas a 5°C y equilibradas a esa temperatura durante 30 minutos. Posteriormente, estas muestras fueron cargadas con una Pipeta de 1000 μl con punta azul recortada de tal manera que permitió generar gotas de 30 μl y éstas fueron sumergidas directamente sobre el NL_2 dejando caer desde una altura de 15 cm aproximadamente. Las esferas o pellets fueron almacenados dentro de tubos Falcon de 15 ml y entonces contenidos en el tanque de NL_2 hasta su posterior análisis. La descongelación se realizó colocando los pellets en vasos de precipitación de 20 ml mantenidos en un baño María atemperado a 65°C . Rápidamente, cuando los pellets fueron derretidos, el contenido fue recogido con la pipeta de 1000 μl y almacenado en un tubo eppendorf de 1,5 ml a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.6. Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente fueron analizados estadísticamente en un software Statistica para Windows v.12 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

Los datos fueron expresados en media \pm SEM (error estándar de la media). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística *Shapiro Wilk* para determinar la normalidad. Las variables porcentuales y numéricas que no cumplieron una distribución normal fueron transformados al “*Arcoseno*” o “*Log-10*”, respectivamente. Un ANOVA unidireccional bajo un modelo lineal general (GLM) fue utilizado para determinar las diferencias estadísticas entre protocolos las muestras de espermatozoides epididimario antes y después de la criopreservación de



ambos métodos. Cuando ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. La significancia se estableció en $P < 0,05$. Las variables de respuesta (o independientes) analizadas en esta investigación fueron las resultantes de la cinética espermática (motilidades, velocidades, parámetros de relación, amplitud del desplazamiento de la cabeza y frecuencia de batida de flagelo), integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) y morfometría de la cabeza (largo, ancho, área y perímetro).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Variables de cinética espermática:

Los valores promedios (\pm error estándar de la media) de todos los parámetros cinéticos de las muestras frescas y criopreservadas con el protocolo CC y CU se muestran en el Anexo 1.

En general, a excepción de los parámetros de relación (STR, LIN y WOB), los parámetros cinéticos tales como las motilidades (MT y MP), velocidades (VCL, VAP y VSL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) fueron afectados por la criopreservación evidenciando una reducción ($P < 0,05$) de sus valores después de la congelación–descongelación con ambos métodos en comparación con sus valores antes de la congelación (fresco).

Una reducción significativa de la MT fue evidenciada después de congelar con CC ($P < 0,05$) y con CU ($P < 0,01$) comparado con los valores antes de la congelación (fresco). Sin embargo, los resultados muestran que las muestras espermáticas congeladas con CC usando dos rampas de flotación en vapores de NL_2 produjo una MT superior ($P < 0,05$) que aquellas muestras congeladas con CU. En la MP también se evidenció una reducción ($P < 0,05$) de sus porcentajes después de congelar con ambos métodos. No obstante, la MP no difirió ($P > 0,05$) entre los métodos de congelación (Fig. 8).

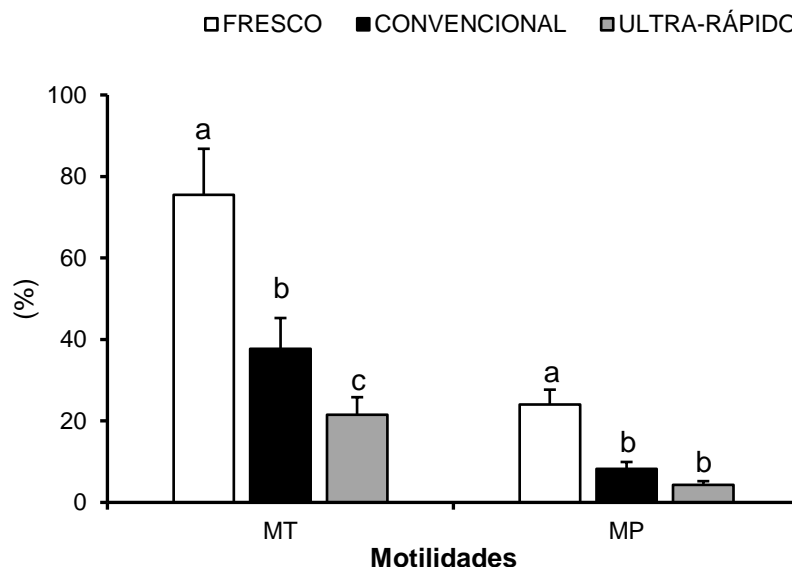


Figura 8. Porcentaje de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b – c, $P < 0,05$; a – c, $P < 0,01$.

Los valores de VCL y VAP no difirieron significativamente ($P > 0,05$) entre métodos de congelación. Sin embargo, solo en las muestras congeladas con CC mostró una reducción significativa ($P < 0,05$) de la velocidad rectilínea (VSL) comparado con aquellas muestras frescas antes de la congelación. Al igual que las VCL y VAP, la VSL no difirió significativamente ($P < 0,05$) entre los métodos de congelación (Fig. 9).

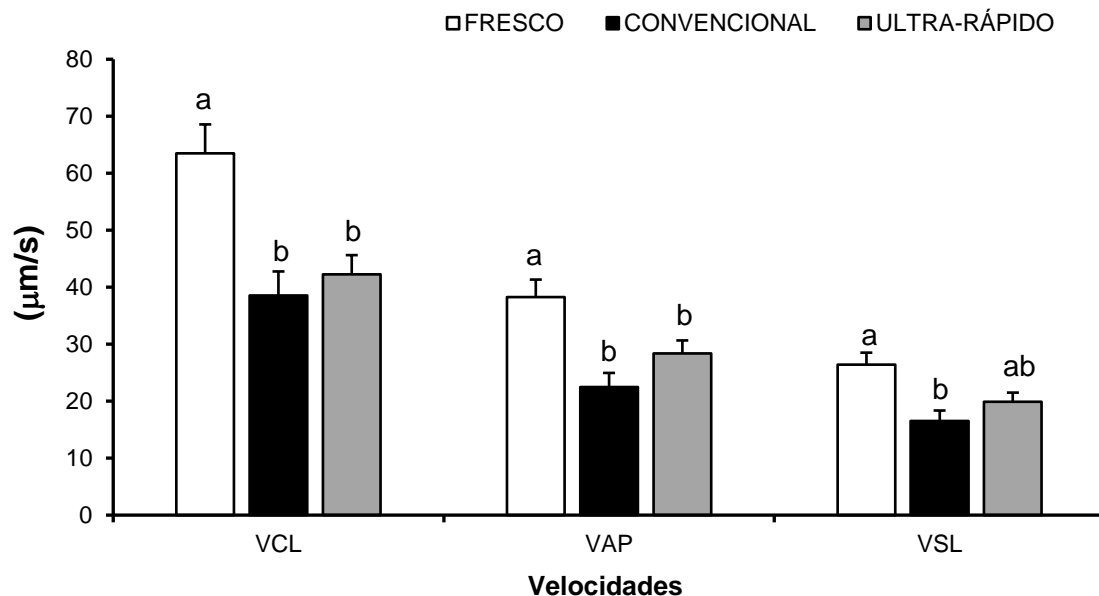


Figura 9. Velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP) y velocidad rectilínea (VSL) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b, $P < 0,05$.

Los parámetros de relación que expresan movimiento (STR, LIN y WOB) de las muestras criopreservados mediante CC y CU no se vieron afectados por criopreservación, demostrando que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los dos métodos de criopreservación (Fig. 10).

El valor de ALH no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre métodos de congelación CC y CU. Sin embargo, solo las muestras congeladas con CC mostró

una reducción significativa ($P < 0,05$) de la frecuencia de batida de flagelo (BCF) comparado con aquellas muestras frescas antes de la congelación. Del mismo modo, el valor de BCF no difirió significativamente ($P < 0,05$) entre los métodos de congelación (Fig. 11).

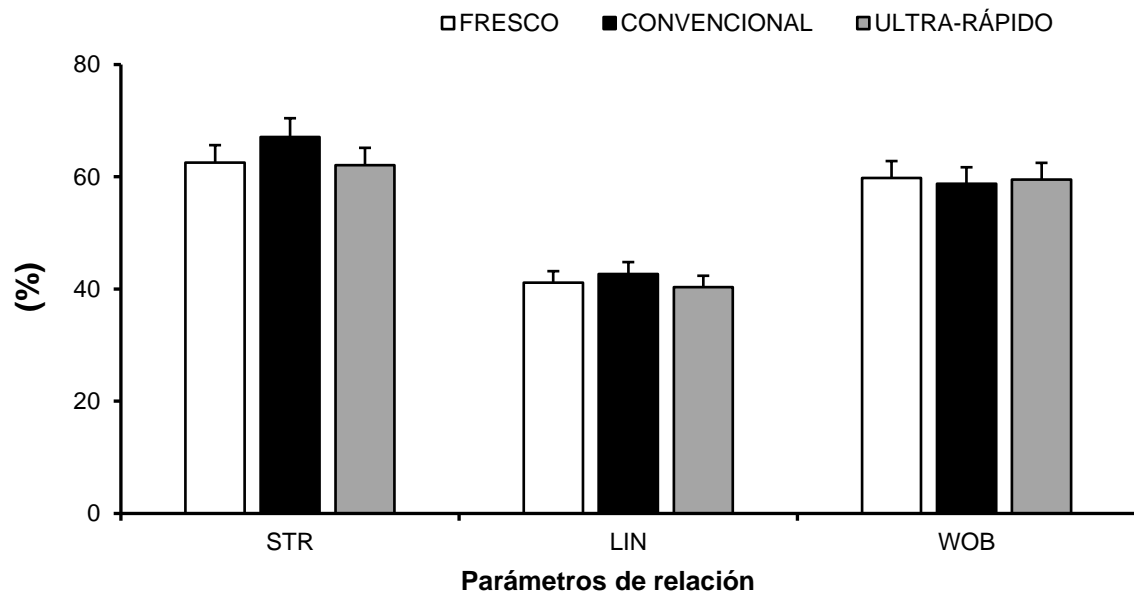


Figura 10. Parámetros de relación que expresan rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU).

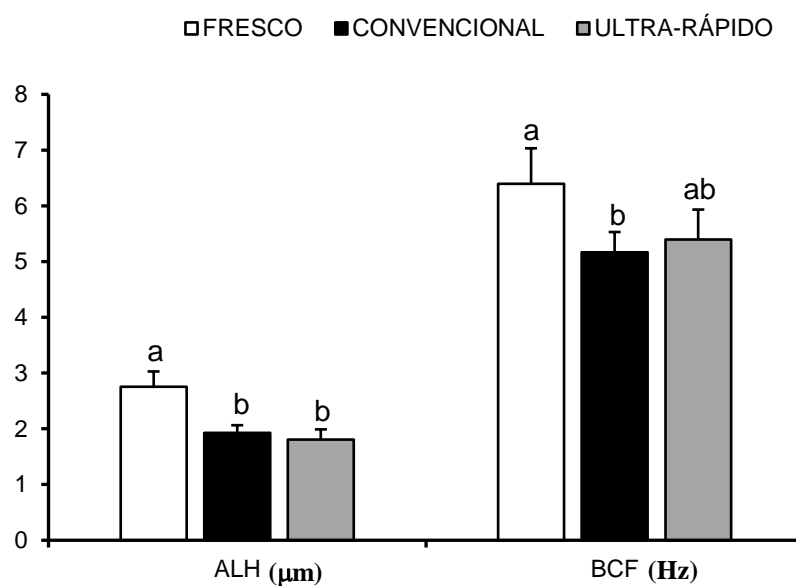


Figura 11. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de flagelo (BCF) de muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b, $P < 0,05$.

Los análisis de los resultados demuestran que fue posible recuperar eficientemente espermatozoides viables y mótils de testículos (de perros orquiectomizados) almacenados durante 96 horas en frío. De hecho, se ha demostrado que la criopreservación de espermatozoides caninos epididimarios se puede realizar mediante métodos similares a los establecidos para eyaculados de la misma especie, y que, a pesar de algún daño, los espermatozoides conservan su capacidad funcional (Hewitt et al., 2001; Yu y Leibo, 2002). Por lo tanto, esta investigación demostró que fue posible criopreservar eficientemente los espermatozoides epididimarios caninos con resultados deseables de motilidad y viabilidad después de la criopreservación convencional o ultrarrápida para usarlos en técnicas de reproducción asistida como ICSI (*intra-cytoplasmic sperm injection*) (Isachenko et al., 2012). Incluso, estos procedimientos podrían servir de modelo para usarlo en espermatozoides de caninos silvestres que han fallecido bajo situaciones inesperadas, siempre y cuando los testículos junto con sus epidídimos, estén intactos y almacenados a bajas temperaturas.

Se ha determinado que la motilidad no se despliega en el epidídimo, por varias razones: la falta de sustrato energético, la baja tensión de oxígeno y la presencia de una proteína secretada por el epitelio que reviste el epidídimo conocida como “inmobilina” (Gil-Laureiro, 2020). Una vez cumplida la etapa de maduración en el epidídimo, los espermatozoides están listos para continuar su tránsito hacia el conducto deferente y al momento de la eyaculación entran en contacto con los compuestos de plasma seminal. La fructosa secretada por las vesículas seminales, es el sustrato energético exógeno más abundante en la mayoría de los animales (incluyendo el perro) (Amann, 1981). Esto no sucede en los espermatozoides de origen epididimario, lo cual les convierte en espermatozoides más sensibles al choque de frío pudiendo causar la degeneración de la membrana espermática y reducción drástica de la motilidad. Sin embargo, los espermatozoides epididimarios parecen ser más crioresistentes que los espermatozoides eyaculados, con



diferencias en la composición de la membrana (Eddy y O'Brien, 1994; Jones, 1998; Varisli et al., 2009) que influyen en el tiempo de equilibrio requerido (Rath y Niemann, 1997). De esta manera se puede explicar que el tiempo de equilibramiento usando en la congelación CU fue menor (30 minutos) a la congelación CC debido a que el disacárido sacarosa puede resultar tóxico y degenerativo para la membrana plasmática.

Investigaciones anteriores han reportado que la criopreservación en todos sus procesos produce efectos deletéreos (perjudiciales) a las células espermáticas, y por lo tanto, los parámetros de motilidad y viabilidad se reducen entre un 30 a 40% comparado con los valores pre-congelación (Watson, 2000). Otros autores sugieren que aproximadamente el 50% de los espermatozoides sobreviven a la criopreservación, lo que produce en efecto, tasas de fertilidad bajas (Watson, 1995). Asimismo, se ha determinado que durante la criopreservación, los espermatozoides sufren cambios estructurales, bioquímicos y funcionales que limitan la supervivencia celular y la capacidad fecundante (Maxwell et al., 1993). La criopreservación induce la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), la interrupción del potencial de la membrana mitocondrial y un fenómeno similar a la apoptosis en los espermatozoides. Estos cambios están asociados con alteraciones en los compuestos de la membrana del esperma, lo que resulta en reducciones dramáticas en la motilidad, viabilidad y capacidad de fertilización (Yoon et al., 2016). Se ha demostrado que la técnica de congelación CC causa un daño físico y químico de las membranas espermáticas extracelulares e intracelulares debido a cambios en la transición de la fase lipídica y/o aumento de la peroxidación lipídica durante la saturación con crioprotectores. Esta peroxidación lipídica conduce a una disminución de la velocidad, la motilidad del esperma, la morfología, la viabilidad e integridad de las membranas (O'Connell et al., 2002).

Por otro lado, la criosupervivencia espermática está influenciada, principalmente, por la velocidad de enfriamiento durante el rango crítico de temperatura (-5°C a -25°C) (Woelders, 1997). El daño que pueden sufrir los espermatozoides durante la criopreservación se atribuyen a la producción de cristales de hielo intracelular, estrés osmótico debido a la formación de soluciones hipertónicas extracelulares (Yoon et al., 2015; Yoon et al., 2016) y deshidratación celular (Grötter et al., 2019). Estos daños celulares están determinados directamente por las velocidades de enfriamiento (Mazur, 1977). El principal daño estructural evidenciado bajo



microscopía electrónica de barrido criogénico (Crio-SEM), tanto en congelación ultrarrápida como convencional, es la degeneración de la membrana plasmática que causa la muerte celular (Bóveda et al., 2018). Otros daños importantes se atribuyen a la pieza intermedia y las mitocondrias durante de la congelación y descongelación (Galarza et al., 2019a). En consecuencia, el daño mitocondrial provoca una falla en el sistema de fosforilación oxidativa, generación de ATP y liberación de energía para el movimiento (Windsor, 1997). Por lo tanto, velocidades de enfriamiento altas (ej. 40°C/min) como las que usa la congelación convencional, provocan un daño a la membrana plasmática y mitocondrial, y en efecto, los espermatozoides se mueren o quedan estáticos (Galarza et al., 2019b).

Los resultados del presente estudio muestran una reducción de la motilidad total de aproximadamente 38 y 54% con el método de congelación, CC y CU, respectivamente. Estos resultados sugieren que la criopreservación ultrarrápida podría afectar más a las mitocondrias y disminuir la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP), que puede afectar la motilidad de los espermatozoides (Celeghini et al., 2007) y las variables cinéticas (Ashrafi et al., 2011). Se ha sugerido que los espermatozoides en diluyentes que contienen disacáridos (ej. sacarosa) pierden su motilidad más rápidamente durante la incubación posterior a la descongelación que en diluyentes que contienen glucosa o fructosa, probablemente porque los espermatozoides metabolizan más fácilmente estos monosacáridos (Molinia et al., 1994). La sacarosa, con su mayor peso molecular y menor permeabilidad, está limitado como fuente de energía dada su incapacidad para atravesar fácilmente las membranas plasmáticas (Isachenko et al., 2008).

Otra teoría que podría explicar la baja motilidad obtenida después de la congelación ultrarrápida se debe a que la sacarosa interfiere con el uso de la glucosa que se metaboliza fácilmente. Es bien conocido que el transporte de glucosa parece inhibirse en presencia de disacáridos (Parche et al., 2006).

Los resultados de esta investigación, además demostraron que el efecto deletéreo de la CU no fue evidenciado en las velocidades y parámetros de relación que expresan movimiento y progresividad (ej. VCL, VSL, STR, LIN, ALH y BCF) debido que no hubo diferencias significativas de esos valores entre ambos protocolos de criopreservación. Esto resultados indican que la CU seguida de una descongelación rápida (calentamiento a 65 °C) fue más perjudicial para los parámetros de motilidad que una descongelación lenta (calentamiento a 37 °C).



Estos resultados son superiores y consistentes a los obtenidos por Caturla-Sánchez et al. (2018), obteniendo bajas motilidades (MT y MP) después de vitrificar espermatozoides caninos provenientes de eyaculados con 250 mM de sacarosa comparado con la congelación convencional. De hecho, dicha investigación mostró una cinética (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) similar en las muestras congeladas y en las vitrificadas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación indican que congelar espermatozoides epididimarios de perro en pellets de 30 μ l provenientes de muestras diluidas con Tris y 250 mM de sacarosa y usando velocidades de enfriamiento excesivamente rápidas resultan una alternativa útil debido a la respuesta cinética obtenida. No obstante, se necesita estudiar más factores que permitan mejorar las motilidades después de la criopreservación.

5.2. Integridad de membranas plasmática y acrosomal

Los valores promedios (\pm error estándar de la media) correspondientes al estado de las membranas espermáticas que demuestran la integridad o daño del plasmalema y/o acrosoma simultáneamente de las muestras frescas y criopreservadas por el protocolo convencional y ultra-rápido, se muestran en el Anexo 2.

El porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y acrosoma íntegro (IPIA) fue afectado por los procesos de criopreservación evidenciando una reducción significativa de sus valores después de la congelación - descongelación ($P < 0,05$). Sin embargo, el porcentaje de IPIA no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre los métodos de congelación CC y CU. Esta categoría de espermatozoides son los más deseables debido a que mantienen la integridad de las membranas espermáticas necesarias para mantener la capacidad fecundante después de una inseminación artificial como ha sido demostrado en espermatozoides epididimarios refrigerados durante varios días y luego criopreservados (Soler et al., 2005). Se observó un porcentaje más bajo ($P < 0,05$) de espermatozoides con membranas plasmáticas intacta y acrosoma dañado (IPDA) después de la congelación CC en comparación con la pre-congelación (fresco) y congelación CU. Esto sugiere que la congelación CU genera más daño de acrosoma en espermatozoides vivos (o con la membrana plasmática íntegra). Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) y acrosoma íntegro (DPIA)

incrementó después de congelar con el método CC ($P < 0,01$) y con CU ($P < 0,05$); no obstante, la congelación CU produjo un menor ($P < 0,05$) porcentaje de DPIA que la congelación CC. Asimismo, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) y acrosoma dañado (DPDA) incrementó después de congelar con los dos métodos ($P < 0,05$) (Fig. 12).

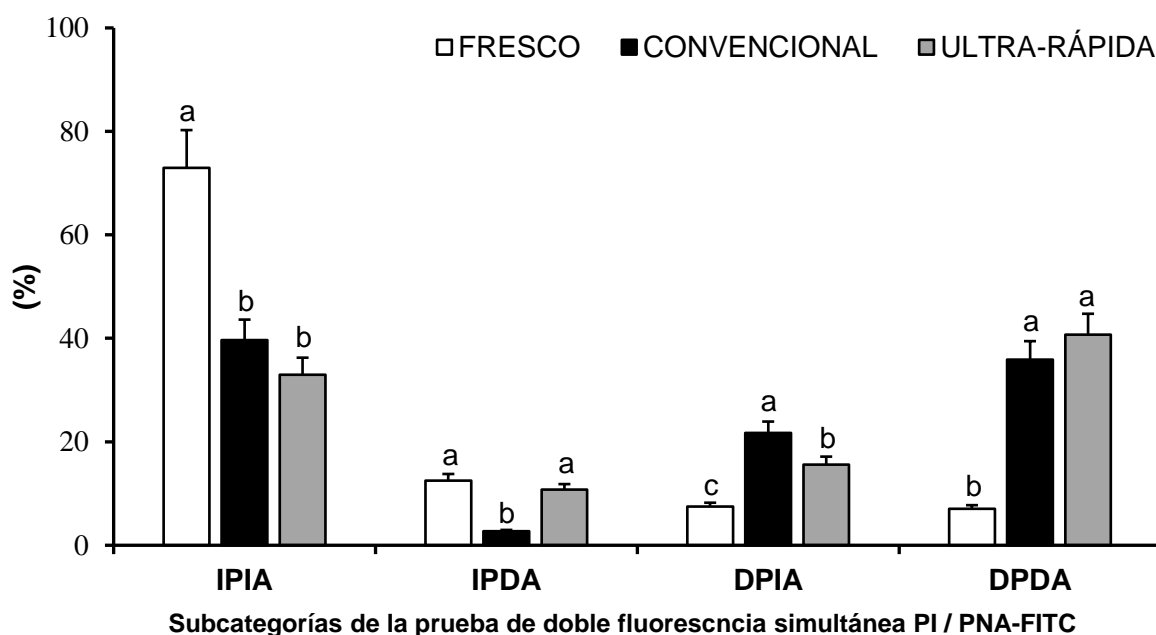


Figura 12. Estado de las membranas plasmática y acrosomal evaluadas en las diversas subcategorías mediante la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC en muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b – c, $P < 0,05$; y a – c $P < 0,01$.

La integridad de las membranas plasmática (IMP) y acrosomal (IMA) se vio afectada por el proceso de criopreservación evidenciando una reducción significativa ($P < 0,01$) de sus porcentajes después ambas congelaciones. El porcentaje de IMP no difirió ($P > 0,05$) entre los métodos de congelación CC y CU. Estos resultados sugieren que la viabilidad o la criosupervivencia espermática es igual de similar al momento de congelar con el protocolo ultra-rápido. Sin embargo, la IMA fue inferior ($P < 0,01$) con la congelación CU comparado con la congelación CC (Fig. 13).

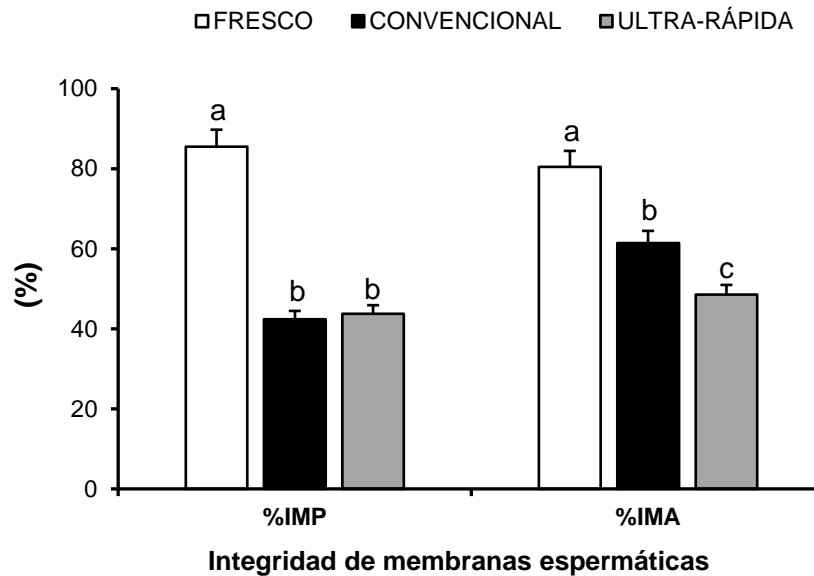


Figura 13. Integridad de la membrana plasmática y acrosomal de las muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b – c, $P < 0,05$; y a – c $P < 0,01$.

A pesar de que los parámetros de motilidad se vieron fuertemente afectados, la técnica de CU arrojó resultados similares a la CC para la viabilidad (equivalente a la IMP) de los espermatozoides. Esto se puede explicar por la característica de congelación ultrarrápida, que pasa rápidamente por ciertos rangos de temperatura (entre 20 y 5 °C), a los que la membrana del espermatozoide canino es particularmente sensible (Sanchez et al., 2011) y por la acción protectora que pueden desempeñar los disacáridos a ciertas concentraciones (ej. 250 mM de sacarosa) (Isachenko et al., 2008). De hecho, reportes previos ya han informado que la adición de ciertas bajas concentraciones de crioprotectores no permeables como la albúmina y de osmoprotectores como los disacáridos (principalmente sacarosa) en el medio de congelación ultrarrápida (ej. TCG-YH) mejora la criosupervivencia de espermatozoides humanos (Isachenko et al., 2008) y espermatozoides de perro (Sanchez et al., 2011).

La congelación convencional usa el glicerol (agente crioprotector penetrante de elección para la criopreservación de espermatozoides mamíferos), el cual previene la formación de cristales de hielo intracelular e induce tensiones osmóticas (Devismita y Kumar, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que el glicerol tiene



efectos tóxicos en los espermatozoides, como alteraciones físico-químicas que pueden provocar la ruptura de la membrana plasmática o la eliminación de proteínas importantes de la membrana (ej. acuaporinas, Santiago-Moreno y Galarza, 2019), y causar daño de la membrana acrosómica, que se reflejará en una reducción en la fertilidad (Curry, 2000; Watson, 2000).

La congelación ultrarrápida y/o vitrificación, tiene sus propias peculiaridades. El factor decisivo para una criopreservación exitosa es la incompatibilidad de la cristalización del hielo intracelular con los sistemas vivos. Para eliminar la formación de hielo y crear un estado similar al vidrio (vítreo), es necesario enfriar pequeñas suspensiones líquidas o simplemente agua a velocidades ultra altas de congelación. Por otro lado, una investigación reciente determinó el estado físico del medio extracelular después de la criopreservación usando velocidades de enfriamiento ultrarrápidas y demostraron que el medio de congelación ultrarrápida con 100 mM de sacarosa no alcanza la vitrificación después de la criopreservación (no vitrifica por presencia de cristales de hielo intra y extracelular) evidenciados por Crio-SEM (Bóveda et al., 2018). Sin embargo, Caturla-Sánchez et al. (2018) demostraron que usando 250 mM de sacarosa adicionado al medio de congelación si permite llegar a una vitrificación. En la presente investigación especulamos que la congelación ultra-rápida realizada con 250 mM de sacarosa pudo alcanzar una vitrificación, según las dosis altas de sacarosa adicionada al medio TCG-YH reportadas en estudios previos.

Existe evidencia de que la congelación ultrarrápida provoca más daño en la membrana espermática que la congelación convencional lenta, quizás debido a los cristales de hielo extracelulares formados en espermatozoides epididimarios de especies silvestres (Bóveda et al., 2018). De hecho, la microscopía Cryo-SEM no reveló diferencias en los tipos de daño causado por las técnicas de congelación convencional y ultrarrápida. Sin embargo, si fue demostrado que el daño a la membrana plasmática y mitocondrial empeoraba después de la congelación ultrarrápida (Bóveda et al., 2018). Nuestros resultados son consistentes con los resultados de estas investigaciones. Además, ambas investigaciones (Bóveda et al., 2018; 2020) sugieren que la congelación CU puede ser una alternativa útil para la criopreservación de los espermatozoides del epidídimo de otras especies en el campo (ej. caninos silvestres), ya que esta técnica es simple y no requiere equipo ni experiencia sofisticados.



Caturla-Sánchez et al. (2018) demostraron que la integridad de la membrana plasmática fue similar después de la vitrificación de espermatozoides caninos provenientes de eyaculados usando 250 mM de sacarosa adicionada al medio TCG-YH en comparación con la congelación convencional. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en este estudio.

Otro factor importante que determina la criosupervivencia celular es la velocidad de descongelación y/o calentamiento de las muestras criopreservadas. Se ha sugerido que la velocidad de calentamiento es más crítica que la velocidad de enfriamiento en la vitrificación cinética y/o congelación ultra-rápida (Mazur y Seki, 2011). Los resultados del presente estudio sugieren que la descongelación mediante el calentamiento rápido (65 °C) ayuda a prevenir el daño a los espermatozoides epididimarios de perro congelados por la técnica ultra-rápida, a diferencia de los espermatozoides de otros rumiantes silvestres (Pradiee et al., 2017, 2015). Esto apoya la idea de que el daño criogénico que sufren los espermatozoides durante el proceso de vitrificación-calentamiento ocurre de una manera específica en cada especie, dependiendo de las características de la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides, y también del tamaño de los espermatozoides como lo ha demostrado Caturla-Sánchez et al. (2018) en espermatozoides de perros.

Por otro lado, es importante considerar que durante la criopreservación se produce la muerte celular de varios espermatozoides, sin embargo, en los espermatozoides supervivientes puede haber un daño de los orgánulos y de las membranas, reduciendo la eficiencia biológica (ej. la capacidad de los espermatozoides y la reacción del acrosoma) (Bailey et al., 2000). Este efecto si fue evidenciado en el presente estudio debido a que la congelación CU produjo un menor porcentaje de integridad de la membrana acrosomal (IMA) comparado con la congelación CC, independientemente de la integridad de la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que los espermatozoides vivos fueron similares con ambos métodos de criopreservación, pero aquellos obtenidos después de la congelación CU tendrán menos eficacia al momento de fertilizar los ovocitos luego de una IA debido a que presentan una degeneración del acrosoma (Watson, 2000).

El esperma que sobrevive durante el procedimiento de congelación sufre una reducción de la fertilidad y esto se ha relacionado con daños que afectan

negativamente la viabilidad, la motilidad, la membrana plasmática, el acrosoma y el material de la cromatina (Qamar et al., 2020).

5.3. Análisis de morfometría de la cabeza de los espermatozoides

Los valores promedios (\pm error estándar de la media) correspondiente al largo, ancho, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides frescos y criopreservados por el método convencional y ultrarrápido se muestran en el Anexo 3.

La longitud de la cabeza de los espermatozoides criopreservados por ambos métodos no se vieron afectados ($P > 0,05$), y tampoco variaron con respecto a las muestras frescas. Eficientemente, los valores de ancho, área y perímetro de las muestras criopreservadas por la congelación CU no mostraron diferencias ($P < 0,05$) significativas en comparación con las muestras frescas (antes de congelar). Estos resultados sugieren que la congelación CU no produjo un daño osmótico, mecánico ni estructural durante el proceso de congelación y descongelación. Sin embargo, estos efectos no fueron evidenciados en las muestras criopreservadas con la congelación CC. Los valores del ancho, área y perímetro incrementaron significativamente ($P < 0,05$) en muestras criopreservadas con el método CC en comparación con las muestras frescas. De hecho, el ancho de espermatozoides congelados con CC fue mayor ($P < 0,05$) comparado con CU (Fig. 14)

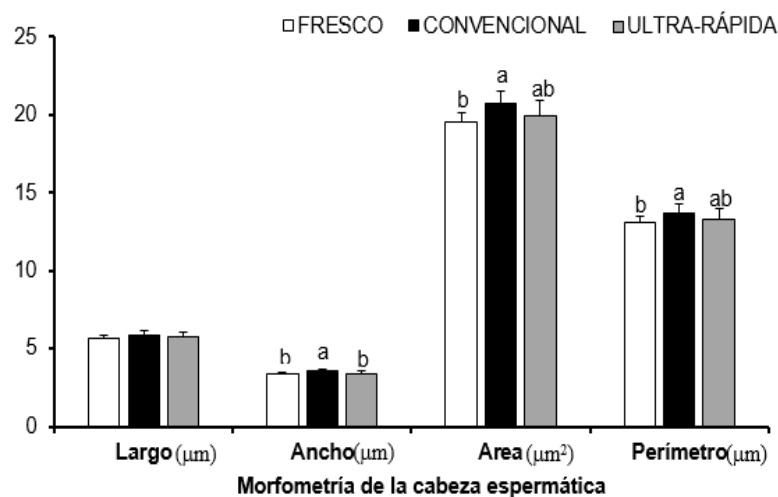


Figura 14. Largo, ancho área y perímetro de las muestras frescas-diluidas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y la congelación ultra-rápida (CU). Letras diferentes entre cada tratamiento muestran diferencias significativas. a – b, $P < 0,05$.



El proceso de congelación afecta a los espermatozoides provocando una gran extensión del grado de lesión celular, siendo responsable de poblaciones más heterogéneas en tamaño y forma de la cabeza espermática (Esteso et al., 2006). Los efectos de la criopreservación sobre la morfometría de la cabeza de los espermatozoides epididimarios se han estudiado en numerosas especies domésticas y silvestres y se ha determinado una reducción del tamaño de la cabeza comparado con el tamaño antes de la congelación (Bóveda et al., 2018; Esteso et al., 2006; Hidalgo et al., 2007; Pradiee et al., 2016). Se han propuesto muchas teorías para explicar esto, como la sobre-condensación de la cromatina espermática, o la presencia de un mayor número de espermatozoides con un acrosoma dañado o perdido, o por el estrés osmótico experimentado durante la congelación y descongelación provocando daños en la membrana celular y citoesqueleto (Arruda et al., 2002; Gao y Zhou, 2012; Santiago-Moreno et al., 2016). De hecho, la crio-resistencia de los espermatozoides puede estar relacionada con el grado de cambios en la dimensión de la cabeza durante la congelación – descongelación (Santiago-Moreno et al., 2016).

El presente trabajo mostró que la congelación CC mostró un incremento significativo después de la criopreservación comparado con sus valores sin congelar (fresco). Estos resultados sugieren que estos espermatozoides probablemente presentaron un acrosoma dañado o un estrés osmótico durante el proceso de congelación y descongelación.



6. CONCLUSIONES

- En resumen, los resultados de la presente investigación demostraron que fue posible recuperar eficientemente espermatozoides viables y móviles de testículos (de perros orquiectomizados) almacenados en frío a largo plazo.
- El proceso de congelación ultrarrápida que usa 250 mM de sacarosa adicionada al medio de congelación afecta la motilidad total y progresiva en comparación con la congelación convencional que usa dos rampas de congelación en vapores de NL_2 . Sin embargo, el logro de niveles de cinética (velocidades, parámetros de progresión y progresividad) y viabilidad espermática similares a los de la congelación abre buenas expectativas.
- Finalmente, la congelación CU no afecta a el tamaño de los espermatozoides medidos en largo, ancho, área y perímetro. Por lo tanto, la congelación ultrarrápida podría garantizar la criosupervivencia de los espermatozoides con gran cantidad de beneficios debido a su sencillez, bajo costo y rapidez.



7. RECOMENDACIONES

- Debido a los resultados obtenidos, se puede recomendar tanto la congelación ultrarrápida como la convencional para criopreservar espermatozoides epididimarios de perros orquiectomizados a pesar de que los testículos y sus epidídimos fueron almacenados más de 96 horas en condiciones de frío. En consecuencia, la criosupervivencia espermática encontrada después de criopreservar con ambos métodos puede dar acceso al uso de los espermatozoides para técnicas de reproducción asistida como FIV o ICSI.
- Se recomienda usar nuevos aditivos y crioprotectores disacáridos (ej. trehalosa y/o combinaciones con sacarosa) suplementados a los medios de congelación como el TCG-YH que permitan mejorar las motilidades después de los procesos de criopreservación.
- Finalmente, se recomienda evaluar la fertilidad de estos espermatozoides criopreservados ya sea bajo condiciones *in vivo* o *in vitro* (ej. fecundación *in vitro* homóloga o heteróloga)



8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, A., & Madrigal, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29, 469. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Alamo Santana, D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: Utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de - 152 °C. *Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*, 37.
- Allen, W. E. (1998). Allen's Fertility and Obstetrics in the Dog. *Australian Veterinary Journal*, 76(8), 570–570. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb10222.x>
- Amann, R. P. (1981). A Critical Review of Methods for Evaluation of Spermatogenesis from Seminal Characteristics. *Journal of Andrology*, 2(1), 37–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1981.tb00595.x>
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., & Arslan, H. O. (2019). Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology*, 88, 75–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.008>
- Armas R., S., Fernández A., V., Vásquez C., M., & Santiani A., A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía . *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú* . scielo .
- Arruda, R. P., Ball, B. A., Gravance, C. G., Garcia, A. R., & Liu, I. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, 58(2), 253–256. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00858-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00858-0)
- Ashrafi, I., Kohram, H., Najjian, H., Bahreini, M., & Mirzakhani, H. (2011). Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*, 4(1), 547. <https://doi.org/10.1186/1756->



0500-4-547

- Aulesa, C., Alonso, R., Benítez, M., & Martínez, M. (2009). Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzer® (SCA) para análisis del semen. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2008.09.001>
- Ávalos, A., Gonzáles, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2013). Recolección y manipulación seminal in vitro. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1–7.
- Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L. M., Grabow, M., Legred, J., & Ostwald, D. J. (2010). AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(4), 285–296. <https://doi.org/10.5326/0460285>
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., ... Tainturier, D. (2012). The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 440–447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.027>
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 282–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Iberoamericana de Fertilidad*, 2.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80(7), 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.019>
- Bóveda, P., Estesó, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A.,



- Muñiz, A., ... Santiago-Moreno, J. (2018). Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 192, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.010>
- Bóveda, Paula, Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Estesó, M. C., López-Sebastián, A., Rizos, D., ... Santiago-Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PloS One*, 15(1), e0227946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Brinsko, S. P., Crockett, E. C., & Squires, E. L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00331-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00331-9)
- Bunyaga, A., & Kashoma, I. (2017). Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: a review article. *Tanzania Veterinary Journal*, 35(Special Issue), 213-224
- Cary, J. A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J. T., Duoos, L., & Fahning, M. L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 45(1), 35–41. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14992252>
- Caturla Sánchez, E., Sánchez Calabuig, M., Pérez Gutiérrez, J. F., Cerdeira, J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2017). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.11.001>
- Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., & Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 42(5), 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., & Gliozzi, T. M. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*,



121(3), 395–401. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210395>

- Cooper, T. G. (2011, January). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>
- Curry, M. R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5(1), 46–52. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050046>
- Dearing, C. G., Kilburn, S., & Lindsay, K. S. (2014). Validation of the sperm class analyser CASA system for sperm counting in a busy diagnostic semen analysis laboratory. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 17(1), 37–44. <https://doi.org/10.3109/14647273.2013.865843>
- Devismita, D., & Kumar, A. (2015). Effect of cryoprotectant on optimal cooling rate during cryopreservation. *Cryobiology*, 70(1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.002>
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Directorio cartográfico de Google Maps. (2020). Mapa Geográfico del Ecuador. *Google Maps*.
- Dorsten, C. M., & Cooper, D. M. (2004). Use of body condition scoring to manage body weight in dogs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 43(3), 34–37.
- Eddy, E. M., & O'Brien, D. A. (1994). *The Physiology of Reproduction*, 29–77.
- Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Soler, A. J., Montoro, V., Quintero-Moreno, A., & Garde, J. J. (2006). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 41(3), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00676.x>
- Ettinger, J., & Feldman, E. (2010). Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat. In: Book Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and the cat. *Elsevier Saunders*.



- Farstad, W. (2009). Cryopreservation of Canine Semen - New Challenges. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, 336–341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01418.x>
- Filho, A. C. M., Silva, H. V. R., Nunes, T. G. P., de Souza, M. B., de Freitas, L. A., de Araújo, A. A., & da Silva, L. D. M. (2014). Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology*, 69(1), 17–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.013>
- Frandsen, R., & Spurgeon, T. (1995). *Anatomía y fisiología de los animales domésticos* (5th ed.). México: Interamericana McGraw-Hill.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, 91, 84–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.007>
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019). *Effectiveness of two-step accelerating cooling rate on post-thaw characteristics of ram sperm*.
- Galarza, D. A., Sebastian, L., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.022>
- Gao, D., & Zhou, X. (2012). Prevention of Lethal Osmotic Injury to Cells During Addition and Removal of Cryoprotective Agents: Theory and Technology. <https://doi.org/10.5772/34473>
- Gatti, J.-L., Druart, X., Syntin, P., Gúerin, Y., Dacheux, J.-L., & Dacheux, F. (2000). Biochemical Characterization of Two Ram Cauda Epididymal Maturation-Dependent Sperm Glycoproteins¹. *Biology of Reproduction*, 62(4), 950–958. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.950>
- Gil-Laureiro, J. (2020). El espermatozoide, desde la espermiación hasta la fecundación. *Reproducción de Los Animales Domésticos.*, 76–82.
- González, S., & Castro, K. (2019). *Métodos modernos de evaluación seminal en*



equinos. Retrieved from <http://repository.ucc.edu.co/handle/ucc/12318>

- Graham, J. K. (1994). Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*, 41(5), 1151–1162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80037-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80037-8)
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73–88.
- Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., & England, G. C. W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1), 101–111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00090-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00090-2)
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., & Dorado, J. M. (2007). The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, 100(1–2), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.003>
- Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). *Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation*. (Animal and).
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 3–22. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J. M., Kreienberg, R., Katkov, I. I., Schulz, M., ... Sánchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136(2), 167–173. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0463>
- Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., ... Isachenko, E. (2012). Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without



- cryoprotectants: new capillary technology. *Journal of Andrology*, 33(3), 462–468. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013789>
- Johnson, C. (2006). Current concepts on infertility in the dog. *Walth Foc*, Vol. 16.
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 53, 73–84.
- König, E., & Liebich, H. (2005). *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas. Panamericana* (Vol. 2). Madrid.
- Ladha, S. (1998). Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized Cell, the Mammalian Spermatozoon. *The Journal of Membrane Biology*, 165(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s002329900415>
- Lucio, C. F., Regazzi, F. M., Silva, L. C. G., Angrimani, D. S. R., Nichi, M., & Vannucchi, C. I. (2016). Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. *Theriogenology*, 85(9), 1568–1575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.016>
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., ... Peña, F. J. (2011). Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x>
- Marais, M., Du Plessis, S., & Huyser, C. (2014). Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, 47. <https://doi.org/10.1111/and.12307>
- Martins, M. I., Justino, R., Sant'anna, M., Trautwein, L., & Souza, F. (2012). Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 6, 293–294. <https://doi.org/10.1111/rda.12042>
- Mater. (2019a). Sistema “CASA SCA®” para el análisis de esperma. *Mater*. Retrieved from <https://www.mater-salta.com/incorporamos-un-nuevo-sistema-casa-sca-para-el-analisis-rapido-y-fiable-de-esperma/>



- Maxwell, W. M., Evans, G., Rhodes, S. L., Hillard, M. A., & Bindon, B. M. (1993). Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, 5(1), 57–63. <https://doi.org/10.1071/rd9930057>
- Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(3), 251–272. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90175-4](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90175-4)
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), C125-42. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mazur, Peter, & Seki, S. (2011). Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, 62(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.10.159>
- Meistrich, M. L. (2010). Can we protect spermatogenesis against testicular insults? Male Reproductive Toxicology. *Handbook of Andrology*, (March), 30–31 to 30–35.
- Molinia, F. C., Evans, G., & Maxwell, W. M. (1994). In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reproduction, Nutrition, Development*, 34(5), 491–500. <https://doi.org/10.1051/rnd:19940510>
- Montoya, A. (2009). Esperpermograma. *Tecnología*, 153.
- Mortimer, S. T., van der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 545–553. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154312>
- Nouri Gharajelar, S., Sadrkhanloo, R. A., Onsori, M., & Saberivand, A. (2016). A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 7(3), 235–239.
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*



(Oxford, England), 17(3), 704–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>

Ochoa, A., & Torres, E. (2012). Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial. *Universidad de Cuenca*.

Parche, S., Beleut, M., Rezzonico, E., Jacobs, D., Arigoni, F., Titgemeyer, F., & Jankovic, I. (2006). Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: *glcP*, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *Journal of Bacteriology*, 188(4), 1260–1265. <https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1260-1265.2006>

Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255–266. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)

Petrunkina, A. M., Gröpper, B., Töpfer, E., & Günzell, A. (2005). Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*, 63(5), 1390–1406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.006>

Pradée, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastián, A., Guerra, R., & Santiago-Moreno, J. (2017). Conventional slow freezing cryopreserves mouflon spermatozoa better than vitrification. *Andrologia*, 49(3). <https://doi.org/10.1111/and.12629>

Pradée, J., Estes, M. C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J. A., ... Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.036>

Pradée, J., O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastián, A., ... Santiago-Moreno, J. (2016a). Effect of shortening the prefreezing equilibration time with glycerol on the quality of chamois (*Rupicapra pyrenaica*), ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis musimon*) and aoudad (*Ammotragus lervia*) ejaculates. *Animal Reproduction Science*, 171, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.06.007>



- Pradiee, J., O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastián, A., ... Santiago-Moreno, J. (2016b). Effect of shortening the prefreezing equilibration time with glycerol on the quality of chamois (*Rupicapra pyrenaica*), ibex (*Capra pyrenaica*), mouflon (*Ovis musimon*) and aoudad (*Ammotragus lervia*) ejaculates. *Animal Reproduction Science*, 171, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.06.007>
- Prapaiwan, N., Tharasanit, T., Punjachaipornpol, S., Yamtang, D., Roongsitthichai, A., Moonarmart, W., ... Manee-In, S. (2016). Low-density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(5), 646–651. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0572>
- Qamar, A. Y., Fang, X., Kim, M. J., & Cho, J. (2020). Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 10(1), 7034. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61803-8>
- Ramónez, J. (2013). *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>
- Rath, D., & Niemann, H. (1997). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47(4), 785–793. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00034-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00034-4)
- Restrepo, G., Vasquez, N., & Garcia, E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4, 119–129.
- Rodriguez, C. (2009). *Evaluación de la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación de espermatozoides congelados de perro*. Universidad de Chile.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Sanchez, R., Risopatron, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., &



- Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: Effect on sperm function. *Andrologia*, 43, 233–241. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01054.x>
- Santiago-Moreno, J., Martínez-Fresneda, L., Martínez-Madrid, B., Toledano-Día, A., Castaño, C., & A., L.-S. (2020). *Fisiología del semen. Cap. 12. Reproducción de los animales domésticos*. Zaragoza, España: Asis, Biomedica S.L.
- Santiago-Moreno, J., Esteso, M. C., Pradiee, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., O'Brien, E., ... Zhihe, Z. (2016). Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) sperm morphometry and function after repeated freezing and thawing. *Andrologia*, 48(4), 470–474. <https://doi.org/10.1111/and.12468>
- Santiago-Moreno, Julian, & Galarza, D. A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18-38.
- Schuster, T. G., Keller, L. M., Dunn, R. L., Ohl, D. A., & Smith, G. D. (2003). Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Human Reproduction*, 18(4), 788–795. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg162>
- Sebastián, S., Selvaraj, S., Aruldas, M., & Govindarajulu, P. (1987). Pattern of neutral and phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. *Reproduction and Fertility*, 79(2), 373–378.
- Silva, A. R., Cardoso, R. C. S., Uchoa, D. C., & Silva, L. D. M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*, 59(3), 821–829. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01130-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01130-5)
- Soler, A. J., Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., & Garde, J. J. (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 degrees C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, 64(7), 1503–1517. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.013>
- Stănescu, M., & Birtoiu, A. (2012). Freezing of dog's sperm: A review. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7709–7716.



- Valverde, A., Arenán, H., Sancho, M., Contell, J., Yániz, J., Fernández, A., & Soler, C. (2016). Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 851–857. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187579>
- Varea Sánchez, M., Bastir, M., & Roldan, E. R. S. (2013). Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. *PloS One*, 8(11), e80607–e80607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080607>
- Varesi, S., Vernocchi, V., Faustini, M., & Luvoni, G. C. (2013). Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-17>
- Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110(3–4), 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.012>
- VeterinarianKey. (2016). Reproductive system | Veterian Key.
- Vieira, L. A. (2013). Estudio de la crioconservación y viabilidad de espermatozoides de epidídimo de caballo. *Proyecto de Investigación*: Retrieved from <http://hdl.handle.net/10201/35952>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/rd9950871>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)
- Windsor, D. P. (1997). Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reproduction, Fertility, and Development*, 9(3), 279–284. <https://doi.org/10.1071/r96109>
- Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *The Veterinary Quarterly*, 19(3), 135–138. <https://doi.org/10.1080/01652176.1997.9694758>



- Woelders, Henri, & Chaveiro, A. (2005). Theoretical prediction of “optimal” freezing programmes. *Cryobiology*, 49, 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.09.001>
- Woodall, P. F., & Johnstone, I. P. (1988). Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 603–609. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820603>
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(6), 799–809. <https://doi.org/10.1071/RD17432>
- Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Animal Reproduction Science*, 156, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.002>
- Yoon, S.-J., Kwon, W.-S., Rahman, M. S., Lee, J.-S., & Pang, M.-G. (2015). A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa. *PLOS ONE*, 10(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126232>
- Yoon, S. J., Rahman, M. S., Kwon, W. S., Ryu, D. Y., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2016). Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 67. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0128-2>
- Yu, I.-J. (2014). Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free Tris. *Cryo Letters*, 35(2), 101–107.
- Yu, I., & Leibo, S. P. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology*, 57(3), 1179–1190. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00711-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00711-7)
- Yu, I., Songsasen, N., Godke, R. A., & Leibo, S. P. (2002). Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, 44(1), 62–78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00005-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00005-6)

9. ANEXOS

Anexo 1. Valores promedios y variabilidad (promedio \pm error estándar de la media) de los parámetros cinéticos del sistema CASA de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y ultra-rápido (CU).

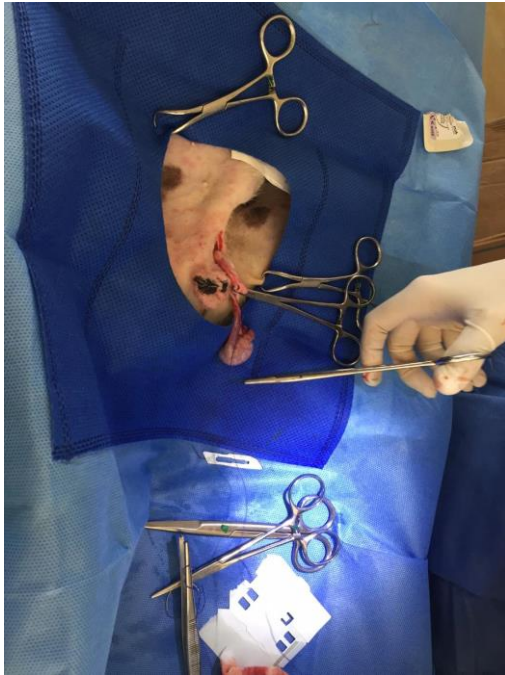
Parámetros cinéticos	Fresco	Congelación		Valor P
		Convencional	Ultra-rápida	
MT (%)	75,5 \pm 3,63 a	37,7 \pm 4,43 b	21,5 \pm 3,02 c	0,0000
MP (%)	24,1 \pm 3,51 a	8,3 \pm 1,64 b	4,3 \pm 0,76 c	0,0000
VCL ($\mu\text{m/s}$)	63,5 \pm 3,84 a	38,5 \pm 2,56 b	42,3 \pm 3,94 b	0,0000
VAP ($\mu\text{m/s}$)	38,3 \pm 2,61 a	22,5 \pm 1,60 b	28,4 \pm 3,02 b	0,0005
VSL ($\mu\text{m/s}$)	26,4 \pm 2,48 a	16,5 \pm 1,32 b	19,9 \pm 2,34 ab	0,0103
STR (%)	62,5 \pm 2,55	67,1 \pm 1,85	62,1 \pm 2,43	0,2352
LIN (%)	41,1 \pm 2,35	42,7 \pm 3,00	40,3 \pm 3,00	0,8244
WOB (%)	59,8 \pm 1,58	58,8 \pm 2,51	59,5 \pm 2,54	0,9416
ALH (μm)	2,8 \pm 0,16 a	1,9 \pm 0,13 b	1,8 \pm 0,11 b	0,0000
BCF (Hz)	6,4 \pm 0,26 a	5,2 \pm 0,32 b	5,4 \pm 0,41 ab	0,0248

Anexo 2. Porcentajes de espermatozoides (promedio \pm error estándar de la media) en las diversas categorías de integridad de la membrana (evaluados con marcadores fluorescentes PI / PNA-FITC) de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y ultra-rápido (CU).

Parámetros de fluorescencia	Fresco	Congelación		Valor P
		Convencional	Ultra-rápida	
IPIA (%)	73,0 \pm 2,76 a	39,7 \pm 1,88 b	33,0 \pm 2,38 b	0,0000
IPDA (%)	12,5 \pm 2,06 a	2,7 \pm 0,62 b	10,7 \pm 1,54 a	0,0001
DPIA (%)	7,5 \pm 0,64 c	21,7 \pm 2,35 a	15,6 \pm 1,48 b	0,0000
DPDA (%)	7,0 \pm 0,86 b	35,9 \pm 2,98 a	40,7 \pm 2,44 a	0,0000
IPM (%) = IPIA + IPDA	85,5 \pm 1,41 a	42,3 \pm 1,94 b	43,7 \pm 2,65 b	0,0000
IMA (%) = IPIA + DPIA	80,4 \pm 2,41 a	61,4 \pm 3,03 b	48,5 \pm 2,51 c	0,0000

Anexo 3. Valores promedio (promedio \pm error estándar de la media) del largo, ancho, área y perímetro de la cabeza de las muestras frescas y congeladas-descongeladas por el método convencional (CC) y ultra-rápido (CU).

Medida	Fresco	Congelación		Valor P
		Convencional	Ultra-rápida	
Longitud (μm)	5,7 \pm 0,11	5,9 \pm 0,05	5,7 \pm 0,04	0,100213
Ancho (μm)	3,4 \pm 0,06 b	3,5 \pm 0,02 a	3,4 \pm 0,03 b	0,048923
Área (μm^2)	19,6 \pm 0,39 b	20,7 \pm 0,26 a	19,9 \pm 0,26 ab	0,030888
Perímetro (μm)	13,1 \pm 0,24 b	13,7 \pm 0,10 a	13,3 \pm 0,11 ab	0,032183



Anexo 4. Proceso Quirúrgico para la obtención de testículos con sus epidídimos intactos (ORH).



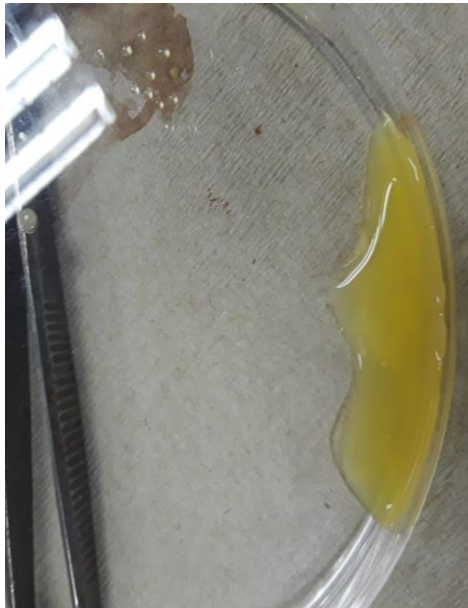
Anexo 5. Testículos con problemas patológicos descartados.



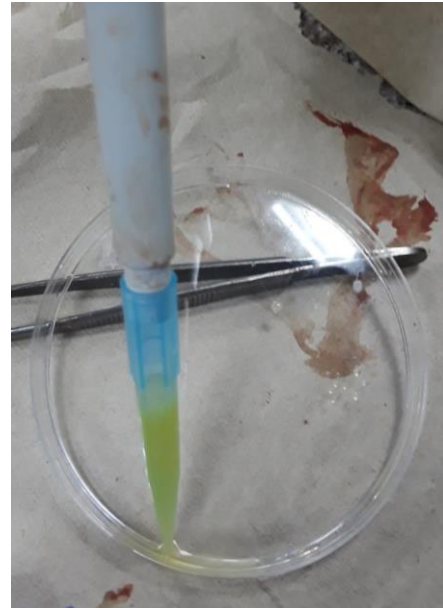
Anexo 6. Disección del epidídimo con sus tres partes intactas y conducto deferente de 1 cm.



Anexo 7. Técnica de flujo retrogrado para la recuperación de espermatozoides epididimarios.



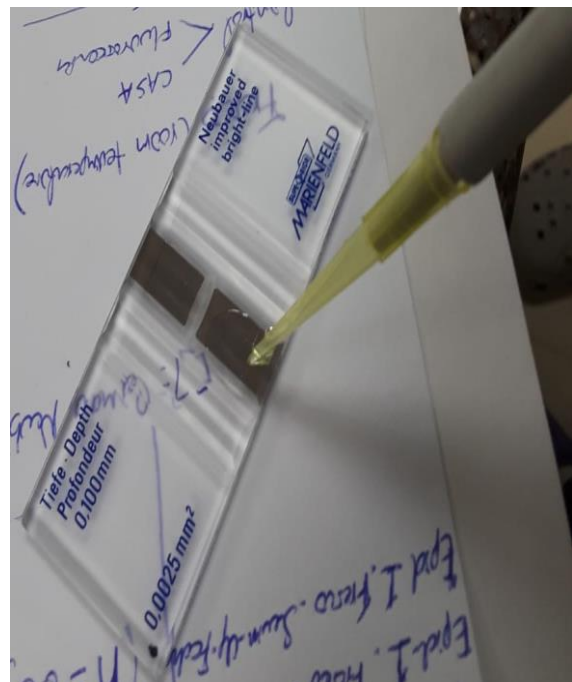
Anexo 8. Material obtenido después de la realización de la técnica de flujo retrogrado.



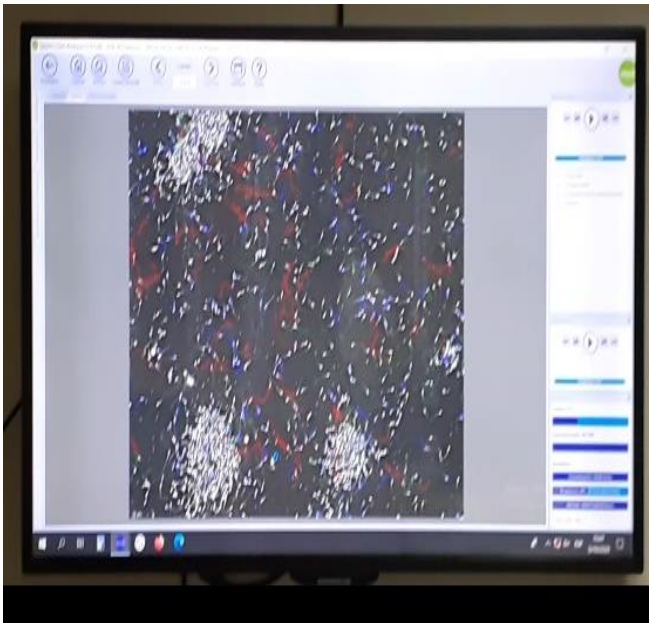
Anexo 9. Material espermático obtenido recogido con una pipeta de 1000 μ l.



Anexo 10. Preparación del material obtenido para realizar los diferentes procesos de medición.



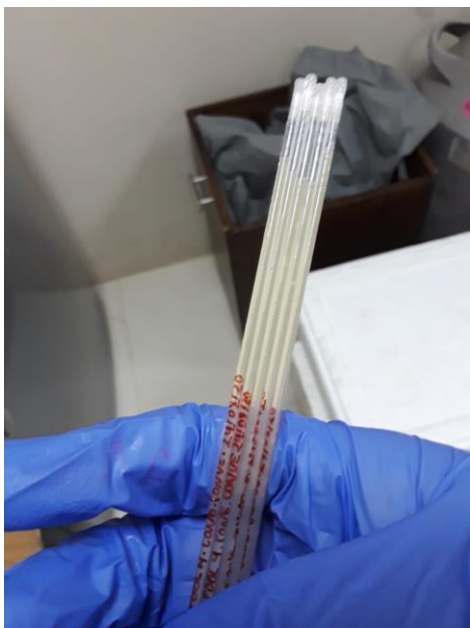
Anexo 11. Cámara de Neubauer con muestra para medir la concentración espermática.



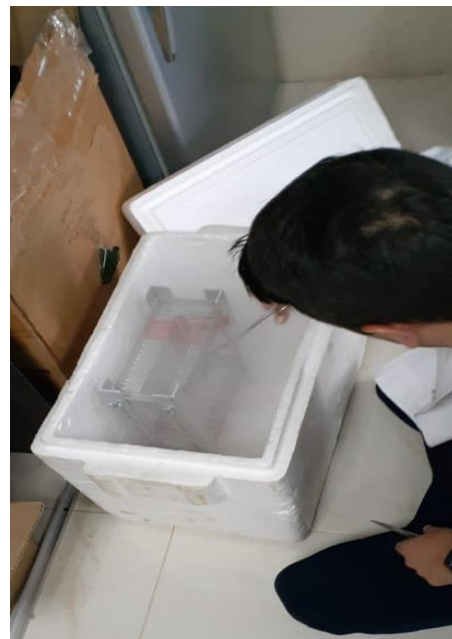
Anexo 12. Medición de parámetros de Motilidad: Total y Progresiva y Cinética.



Anexo 13. Preparación de muestras con tinción Sperm Blue para evaluar morfometría.



Anexo 14. Cargado de pajuelas para realizar el método de congelación convencional (CC).



Anexo 15. Movimiento de las pajuelas de la primera rampa a la segunda en el procedimiento de la congelación convencional.



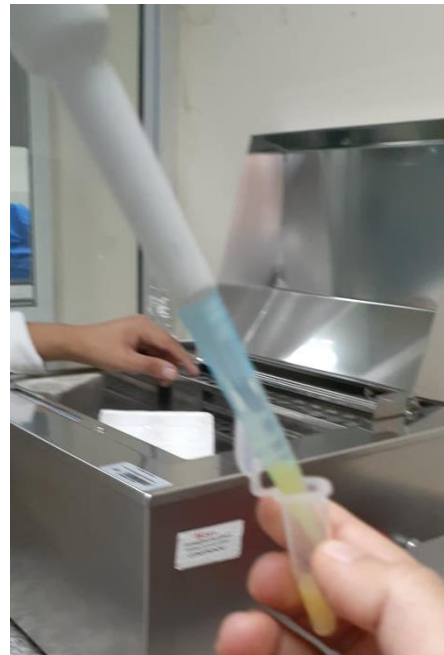
Anexo 16. Gotas de 30 μ l de material espermático sumergidas en NL_2 dejando caer desde una altura de 15 cm.



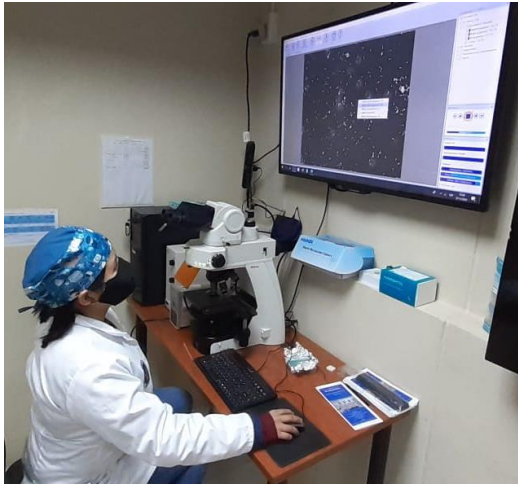
Anexo 17. Pellets formados en la congelación ultrarrápida y colocados en un tubo Falcon de 15 ml.



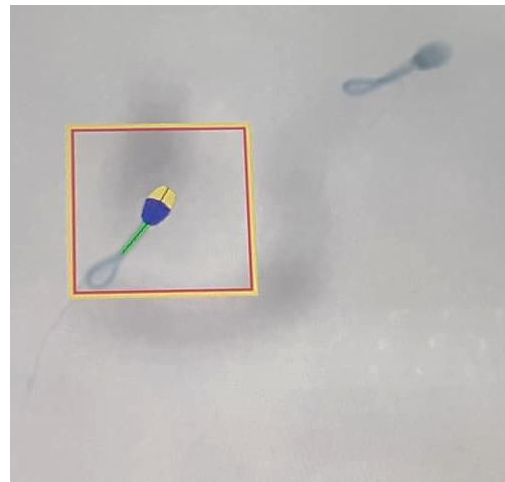
Anexo 18. Pellets colocados en baño María para su descongelamiento.



Anexo 19. Material obtenido después de la descongelación de los pellets en baño María.



Anexo 20. Limpieza de partículas extrañas de las muestras de Motilidad y Cinética.



Anexo 21. Evaluación de morfometría de las muestras con tinción de Sperm Blue.



Anexo 22. Evaluación de la integridad de membranas en donde se observa IPDA, DPIA, DPDA.