

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos

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

Autores:

Juan Diego Ochoa Guillen

CI: 0104924063

Correo electrónico: juan8ag67@gmail.com

David Alejandro Alvarez Palacios

CI: 0104599675

Correo electrónico: davicho_el1@hotmail.es

Director:

Dr. Manuel Elías Soria Parra MgS.

CI: 1801620186

Cuenca – Ecuador

18 de julio - 2022

RESUMEN

La combinación de agentes crioprotectores penetrantes (ACP) como el glicerol (GLY) y la dimetilformamida (DMF), ha demostrado resultados alentadores en la criosupervivencia de espermatozoides equinos. En este sentido, esta investigación evaluó el efecto crioprotector del GLY, la DMF y su combinación, DMF-GLY, sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos. Para este propósito, se recolectó 24 eyaculados de cuatro caballos Árabes, sexualmente adultos y sanos (6 eyaculados / reproductor). Cada eyaculado fue diluido inicialmente con el diluyente Botusemen-Special® y luego congelado con el diluyente Botusemen-Gold® suplementado con GLY (5%), DMF (5%) y GLY-DMF (3%-3%) usando vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático. Las muestras espermáticas frescas y congeladas-descongeladas fueron evaluadas sus variables cinemáticas y la integridad de membranas mediante el sistema computarizado CASA (SCA-Evolution-2018®) y prueba de doble tinción fluorescente (PI / PNA-FITC), respectivamente. Los resultados demostraron que el DMF sólo o combinado con GLY (DMF-GLY) fue más efectivo para proteger a los espermatozoides equinos y producir mayores valores ($P < 0,05$) de motilidad total (MT,%) y progresiva (MP,%), velocidad curvilínea (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de flagelo (BCF) en comparación con el GLY. De hecho, la combinación de DMF-GLY produjo una mayor ($P < 0,05$) velocidad rectilínea (VSL) y promedio (VAP), integridad de la membrana plasmática (IMP, %) y acrosomal (IMA,%) en comparación con el DMF o GLY solos. En conclusión, la combinación de DMF-GLY suplementada al diluyente de base no sintética Botusemen-Gold® fue más eficaz para crioproteger a los espermatozoides de caballo Árabe basado en una mayor cinemática e integridad de membranas en comparación que el glicerol.

Palabras claves: Equino. Dimetilformamida. Glicerol. CASA. Fluorescencia

ABSTRACT

The combination of cryoprotective penetrating agents (CPA), such as glycerol (GLY) and dimethylformamide (DMF), has shown encouraging results in equine sperm cryosurvival. In this sense, this research evaluated the cryoprotective effect of GLY, DMF, and its combination: DMF-GLY, on equine sperm quality and cryosurvival. For this purpose, twenty-four semen ejaculates were collected from four healthy, sexually adult Arabian horses (6 ejaculates/stallion). Each ejaculate was initially diluted with Botusemen-Special® extender and then frozen with Botusemen-Gold® extender supplemented with GLY (5%), DMF (5%), and DMF-GLY (3%-3%) using static liquid nitrogen vapors. The fresh and frozen-thawing sperm samples were evaluated for their kinematics variables and membranes integrity using the CASA computerized system (SCA-Evolution-2018®) and the double fluorescent test (PI / PNA-FITC), respectively. The results showed that DMF alone or combined with GLY (DMF-GLY) was more effective in protecting equine spermatozoa and producing higher values ($P < 0,05$) of total (MT, %) and progressive (MP, %) motilities, curvilinear velocity (VCL), the amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF) compared to GLY. The combination of DMF-GLY yielded higher ($P < 0.05$) strain-line (VSL) and average path velocities (VAP), plasma membrane integrity (IMP, %), and acrosomal membrane integrity (IMA, %) compared to DMF alone or GLY alone. In conclusion, the combination of DMF-GLY supplemented to the 'Botusemen-Gold' non-synthetic-based extender, was more suitable for cryoprotecting Arabian horse sperm based on higher kinematics and membrane integrity compared to glycerol cryoprotectant agent.

Keywords: Equine. Dimethylformamide. Glycerol. CASA. Fluorescence

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	0
ABSTRACT.....	1
INDICE DE CONTENIDO	2
INDICE DE FIGURAS	0
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
ACRÓNIMOS	8
1.INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3. HIPÓTESIS	6
4. REVISION DE LA LITERATURA.....	7
4.1. Criopreservación	7
4.1.1. Criopreservación de semen equino	7
4.2. Agentes crioprotectores.....	8
4.2.1. Crioprotectores no permeables.....	9
4.2.2. Crioprotectores permeables	10
4.3. Daños durante la criopreservación seminal.....	11
4.3.1. Estrés Oxidativo.....	11
4.3.2. Estrés Osmótico.....	12
4.3.3. Estrés Térmico.....	12
4.4. Características generales del eyaculado equino previo a la criopreservación	13
4.4.1. Características espermáticas en el semen equino.....	13
4.4.2. Evaluación seminal.....	14
4.5. Métodos modernos de evaluación seminal.....	14

UCUENCA

4.5.1. Análisis espermático asistido por computador (CASA® Computer Assisted Sperm Analysis)	14
4.5.2 Evaluación de la calidad espermática	15
4.5.3 Características a medir en la evaluación espermática	16
4.5.4. Morfología espermática del semental	17
4.5.5 Evaluación del volumen espermático.....	17
4.5.6 Evaluación del Color y Aspecto del Eyaculado	18
4.5.7 Evaluación de la concentración espermática.....	18
4.5.8 Espermatozoide Equino.....	18
4.5.9 Plasma seminal.....	19
4.5.10 Características del semen.....	19
4.5.11 Examen microscópico.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Materiales.....	21
5.1.1 Materiales físicos	21
5.1.2 Materiales Biológicos.....	21
5.1.3 Reactivos	21
5.1.4 Materiales de Laboratorio.....	22
5.2 Metodología.....	23
5.2.1 Área de estudio.....	23
5.2.2 Unidad Experimental y Diseño Experimental.....	24
5.2.3 Metodología para la investigación.....	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. Nucleación de hielo y disipación del calor latente de fusión	31
6.2. Motilidad y cinética espermática.....	35
6.3 Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.....	41
6.3. Estrés osmótico.....	44
7. CONCLUSIONES.....	46
8. RECOMENDACIONES	47

UCUENCA

9. BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS.....	59
Anexo 1	59
Anexo 2	60
Anexo 3	61
Anexo 4	62
Anexo 5: temperado de VA con agua	63
Anexo 6: verificación de temperatura en la VA	63
Anexo 7: desarmado de la VA retiro de liner usado	63
Anexo 8 : retiro de capuchón protector de luz	63
Anexo 9 : transporte muestras seminales	63
Anexo 10: semen colectado	63
Anexo 11: vaciado de VA.....	63
Anexo 12: preparación yegua	64
Anexo 13: monta de caballo árabe	64
Anexo 14: recolección seminal caballo árabe	64
Anexo 15: vagina artificial tipo Hannover	64
Anexo 16: conteo concentración espermática en cámara de Neubauer	65
Anexo 17: valoración cinética espermática en sistema CASA®	65
Anexo 18: adición de agentes crioprotectores	65
Anexo 19: fluorescencia en microscopio de contraste de fase pre congelación	65
Anexo 20: esterilización en cámara de luz ultravioleta de pajuelas . 66	
Anexo 21: estabilización y empajuelado	66
Anexo 22: congelado vapores de nitrógeno	66
Anexo 23: sumergido pajuelas en nitrógeno líquido	66
Anexo 24: valoración test osmótico con glutaraldehído 2%	67
Anexo 25: prueba de fluorescencia, integridad membrana plasmática y acrosoma.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Agentes crioprotectores	9
Figura 2: Evaluación de la calidad de esperma	16
Figura 3: Ubicación del área de estudio (Cuenca-Azuay).....	23
Figura 4: Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides	26
Figura 5: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T1 congeladas con DMF. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja)	32
Figura 6: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T1 congeladas con GLY. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja).....	32
Figura 7: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T7 congeladas con DMF-GLY. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja).....	33
Figura 8: Motilidad total (MT, %) y Motilidad progresiva (MP, %) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..	35
Figura 9: Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) y rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..	36
Figura 10: Índice de rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %) y oscilación (WOB, %) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..	37
Figura 11: Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batida de flagelo (BCF, Hz) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes	

UCUENCA

crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..38

Figura 12: Porcentajes de espermatozoides en las distintas categorías de integridad de la membrana (evaluadas con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..42

Figura 13: Integridad de la membrana plasmática (IMP, %) y acrosomal (IMA, %) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..43

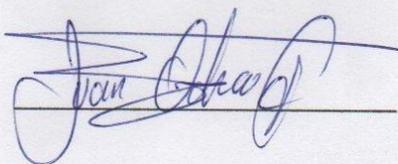
Figura 14: Estrés oxidativo (%) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol)..44

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Juan Diego Ochoa Guillen en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 18 de julio de 2022



Juan Diego Ochoa Guillen

C.I.: 0104924063

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

David Alejandro Alvarez Palacios en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 18 de julio 2022



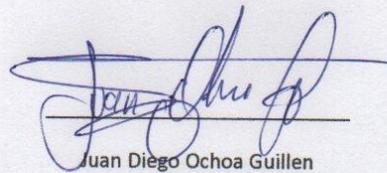
David Alejandro Alvarez Palacios

C.I: 0104599675

Cláusula de Propiedad Intelectual

Juan Diego Ochoa Guillen , autor del trabajo de titulación "Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 18 de julio 2022



Juan Diego Ochoa Guillen

C.I: 0104924063

Cláusula de Propiedad Intelectual

David Alejandro Alvarez Palacios, autor del trabajo de titulación "Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 18 de julio 2022



David Alejandro Alvarez Palacios

C.I: 0104599675

UCUENCA

DEDICATORIA

Esta tesis esta dedica a:

Mis padres Tarquino y Lucia quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir un sueño más, ellos inculcaron en mi esfuerzo, perseverancia y valentía y no temer a las adversidades porque con constancia y sacrificio las metas se cumplen.

Mis hermanos Adriana y Pedro por su cariño y apoyo incondicional en todo el proceso de realización. A mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona. Siempre los llevo en mis pensamientos.

Juan D. Ochoa Guillen.

Esta tesis esta dedicada a:

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por brindarme la vida y la salud para poder alcanzar mis metas, mis padres ROMEO Y GERMANIA, por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi etapa estudiantil, donde me han enseñado el significado del sacrificio, perseverancia, paciencia y responsabilidad para poder alcanzar este sueño de ser médico veterinario.

A mis hermanos Sebastián y Cristina, por apoyarme en todos los momentos que necesitaba de una mano, a mis abuelos por siempre demostrarme ese amor incondicional, a mis amigos que siempre estuvieron en todas las etapas de mi vida muchas gracias a todos, en esta tesis plasmo todos sus deseos, sus pensamientos y buenos deseos hacia mi parte.

David A Alvarez Palacios.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestro director de tesis el Dr. Manuel Soria por la realización de esta investigación, ya que con su apoyo incondicional en todos los ámbitos no habiéramos llegado a cumplir este sueño de ser Médicos Veterinarios Zootecnistas. De igual manera a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, en especial a su Director, el Dr. Andrés Galarza quien, con su apoyo diario, su conocimiento y su paciencia hacia nosotros nos ayudado a terminar con éxitos esta tesis, donde reflejamos nuestras ganas de superación y aportar un pequeño conocimiento a nuestra sociedad. A la Universidad de Cuenca que fue nuestro hogar durante muchos años y jamás nos olvidaremos de todas esas hermosas experiencias vividas en la misma. A nuestros profesores que han sido un pilar importantísimo en nuestro desarrollo académico y nos han servido como fuente de inspiración, no nos queda más que decir que estamos muy agradecidos por todo ese apoyo a cada uno de las personas antes nombradas, muchísimas gracias....

Juan Diego

David Alejandro

ACRÓNIMOS

GLY	Glicerol
DMF	Dimetilformamida
ETG	Etilenglicol
ACP	Agentes crioprotectores penetrantes
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
LPO	Peroxidación lipídica
ADN	Acido desoxirribonucleico
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
GR	Glutación reductasa
GPx	Glutación peroxidasa
VA	Vagina artificial
PI	Yoduro de propidio
PNA- FICT	Agglutinina
KOH	Hidróxido de potasio

UCUENCA

MP	Motilidad progresiva
MT	Motilidad total
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
VAP	Velocidad promedio
LIN	Linealidad
STR	Rectitud
WOB	Oscilación
BCF	Frecuencia de batida de flagelo
ALH	Amplitud del desplazamiento 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

La criopreservación de semen equino, a pesar de su impacto en los programas de cruzamiento y mejora genética, no es una tecnología totalmente establecida. Durante los últimos años, se han propuesto una serie de modificaciones al proceso de congelación, sin embargo, una gran población de caballos aún tiene calidad deficiente del semen y en efecto, bajas tasas de fertilidad después de la inseminación artificial (IA) con semen congelado-descongelado. Posiblemente, la toxicidad del glicerol (GLY) podría ser una razón para la variación en la capacidad de congelación de los espermatozoides equinos. Existen reportes limitados sobre el uso de agentes crioprotectores penetrantes (ACP) alternativos para el esperma equino. Las amidas, han demostrado ser una buena opción para congelar el semen de estas especies. Informes recientes han mostrado datos alentadores con respecto al uso de amidas como crioprotectores para sementales, con mejoras más notables para el semen equino que se congelan mal cuando se usa glicerol.

El proceso de criopreservación provoca cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides que al final se ven reflejados en una reducción de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante (Maxwell et al., 1993; Watson, 2000). Durante el proceso de congelación y descongelación, la población inicial de espermatozoides vivos se reduce aproximadamente un 50%, debido a los efectos deletéreos propios de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, microfilamentos de la cola, y núcleo del espermatozoide (Boiso, 2001). Los daños más importantes que se han evidenciado durante la criopreservación incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial (interrupción) y acrosoma (reacción acrosómica). Igualmente, los procesos de congelación-descongelación determinan una desestructuración de los microtúbulos que conforman el flagelo del espermatozoide (Santiago-Moreno & Galarza, 2019). Todos estos daños mencionados anteriormente, disminuyen la motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides (Watson, 2000).

UCUENCA

Existen otras causas principales que disminuyen la viabilidad espermática tales como el “shock térmico o choque de frío” (Boiso, 2001), acumulación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la membrana espermática, y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Betancur et al., 2013). En consecuencia, estos eventos desencadenan en una peroxidación lipídica (LPO) y un aumento del estrés oxidativo, que finalmente, provoca degeneración y muerte celular (Córdova et al., 2009; Membrillo-Ortega et al., 2003). Por estas razones, el semen equino y su baja criotolerancia sigue constituyendo un hándicap tecnológico al momento de la criopreservación. De esta manera se ha definido una baja respuesta de criosupervivencia espermática provoca una infertilidad en yeguas después de una inseminación artificial a nivel de campo.

Para mitigar los efectos deletéreos propios de la criopreservación, los protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos han usado convencionalmente el GLY. El GLY es el ACP más utilizado para congelar espermatozoides de muchas especies, incluyendo al equino. El GLY tiene un alto peso molecular que atraviesa la membrana plasmática mediante un gradiente de osmolaridad generado con el medio de congelación. Las concentraciones de GLY entre el 3 y 8% (v/v) adicionado a medios de congelación ha sido usado para la congelación de espermatozoides, sin embargo, muchos de sus efectos siguen sin estar claros. Estudios anteriores informaron que GLY reduce la calidad del semen fresco y congelado–descongelado en algunas especies, incluidas el caballo (García et al., 2012). También se ha reportado que el GLY es dañino cuando se agrega a los diluyentes a más de 30°C, así como a concentraciones superiores al 8% o inferiores al 2%. Ciertamente, las concentraciones elevadas de GLY tienen un efecto negativo sobre la integridad de la membrana espermática (Yotov, 2015). Además, GLY es osmóticamente activo que cambia el contenido de agua de los espermatozoides (Sztein et al., 2001) y cualquier estrés osmótico inducido podría reducir la longevidad de los espermatozoides y acelerar la capacitación de los espermatozoides. A pesar de todos estos avances en la criopreservación equina basados en diferentes concentraciones de glicerol (ej. 5%) (Burns & Reasner, 1995; Cochran et al., 1984) en conjunción con curvas de congelamiento (Graham, 1996; Moore et al., 2006) y medios de congelación (Álvarez et al., 2014; Anwer et al., 2014), las tasas de criosupervivencia celular, motilidad,

UCUENCA

integridad de las membranas espermáticas y fertilidad siguen siendo una gran limitante dentro de los programas de conservación de gametos y programas de cruzamiento y mejora genética equina.

Diferentes tipos de ACP penetrantes tales como amidas: metilformamida (MFM), dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF), o el etilenglicol (ETG) y dimetilsulfoxido (DMSO) han sido comparados con el convencional GLY en la criopreservación de espermatozoides equinos (Álvarez et al., 2014; Cook et al., 2019; Wu et al., 2015) sugiriendo una alternativa exitosa al GLY con el uso de las amidas DMA o DMF (Vafaei et al., 2019). Además, se han evaluado el efecto de la combinación de diferentes ACP penetrantes como la MFM, DMF y GLY con ACP no penetrantes como la sacarosa, sin embargo, no se ha evidenciado interacción significativa entre esos crioprotectores (Vafaei et al., 2019). (Perez-Osorio et al. 2008) sugieren que la adición gradual de DMF hasta el 5% (v/v) a intervalos de 1 minuto al diluyente INRA-82® y el uso de enfriamiento lento a 5 °C antes de la congelación, preservó eficientemente la viabilidad de los espermatozoides equinos después de la descongelación.

El uso de las amidas (por ejemplo, la DMA) ha resultado ser un buen ACP para la criopreservación de semen de caballo Árabe en comparación con el GLY (Santiani et al., 2017). Asimismo, la DMF ha demostrado tener efectos crioprotectores similares o incluso mayores al GLY con mejores porcentajes de supervivencia en espermatozoides equinos después del proceso de congelación y descongelación (Mesa et al., 2012). Del mismo modo, se han observado mejoras en motilidad espermática y porcentaje de membranas intactas post – descongelación usando 4% (v/v) de DMF (Morillo Rodriguez et al., 2012). Los porcentajes de adición de DMF que se han usado son de 1 – 5 % (v/v) en medio INRA-82® + yema de huevo (Vidament et al., 2002). En otro estudio se añadió 2,5; 3,5 y 5% (v/v) de DMF al medio INRA-96® + 2,5 % yema de huevo dando como resultado concentraciones finales de 100×10^6 espermatozoides/ml (Wu et al., 2015). Wu et al. (2015) concluyeron que el uso de 3,5% de DMF resulta beneficioso para ciertos parámetros espermáticos como movilidad total y progresiva post-descongelación comparados con otras concentraciones como 2,5 y 5%. Así mismo que la combinación de 2 o más ACP penetrantes produjo diferencias en motilidad progresiva y viabilidad. En

UCUENCA

el caso de la viabilidad la combinación GLY (2/3) + metilformamida (MFA, 1/3) produjo mejores resultados de motilidad progresiva después de la congelación que la combinación GLY (1/3) + MF (1/3) + DMF (1/3) (44,65% vs. 30,96%, respectivamente) (Wu et al., 2015)

El uso de GLY ha mostrado ser muy eficiente en la congelación de semen equino en concentraciones entre 2,5 a 6% (v/v) adicionados al medio de congelación. Sin embargo, la combinación de DMF (2,5%) + GLY (2,5%) adicionados al medio INRA-96® mostró los mejores resultados en los espermatozoides epididimarios de caballo (Álvarez et al., 2014).

Considerando que los diluyentes comerciales Botusemen-Special® y Botusemen Gold®, ambos de base no sintética (proteínas micelares de leche desnatada) con la inclusión de antioxidantes - colesterol y caseína, respectivamente, ha mostrado ser eficaz en protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos bajo condiciones de refrigeración (Gobato, 2020; Lago-Alvarez et al., 2020). Sin embargo, si se adiciona ACP penetrantes como la DMF al 5% o su combinación con el GLY en baja concentración (2,5% de DMF y 2,5% de GLY) podría ser constituir un medio de congelación muy exitoso para congelar semen de caballo árabe como ha sido reportado previamente por (Santiani et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación en la criosupervivencia de espermatozoides de caballo Árabe

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar las curvas de congelamiento que incluya el momento exacto de la nucleación de hielo (seeding) y la disipación del calor latente de fusión durante la congelación de esperma equino con los diferentes agentes crioprotectores dimetilformamida, glicerol y su combinación de dimetilformamida-glicerol.
- Evaluar la cinética e integridad de las membranas plasmática, acrosomal y estrés osmótico de los espermatozoides equinos antes y después de la criopreservación con los diferentes agentes crioprotectores.

3. HIPÓTESIS

Ha: El uso de la DMF al 5% (v/v), solo o combinado con el glicerol 3% – 3 % (v/v) adicionado al diluyente Botusemen-Gold® incrementan la criosupervivencia de espermatozoides equinos basado en una mejor cinética e integridad de las membranas espermáticas comparado con el uso del glicerol al 5% (v/v).

4. REVISION DE LA LITERATURA

4.1. Criopreservación

Actualmente existen dos métodos de conservación del material seminal: refrigerado (5 °C) y criopreservado (-196 °C). La viabilidad del semen refrigerado es capaz de mantenerse hasta por 48 horas de almacenamiento; sin embargo, para poder obtener ventajas en la inseminación artificial, es necesario un periodo prolongado de almacenamiento. Esto se logra mediante la criopreservación del esperma ya que así se detiene el proceso metabólico de los espermatozoides y permite un almacenamiento indefinido sin que exista una pérdida de la fertilidad (Orozco et al., 2011).

La criopreservación consiste en el enfriamiento de células o tejidos a bajas temperaturas (-80 y -196°C) para lograr detener totalmente el metabolismo celular y así asegurar su conservación por un largo tiempo (León et al., 2007). En la criopreservación de material seminal, la conservación se da por disminución del crecimiento bacteriano, la reducción del metabolismo espermático, el control de la acidificación, y la reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno (Ball et al., 2000; Brinsko et al., 2011).

4.1.1. Criopreservación de semen equino

La reproducción es un proceso fundamental en el mejoramiento genético de los equinos ya que permite el uso de los mejores caballos reproductores; por lo que la criopreservación del semen de caballo es una técnica que complementa a los procesos de biotecnología reproductiva. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la habilidad de los espermatozoides entre los sementales para soportar el proceso de congelación, e incluso existe variación de los eyaculados y fertilidad dentro de un mismo caballo (Puga-Torres et al., 2018).

La criopreservación aumenta la disponibilidad de material genético de calidad facilitando así los trabajos de reproducción asistida. Además, se dispone de material seminal de sementales con características deseadas, la posibilidad de almacenamiento de semen

UCUENCA

fuera de la época de apareamiento, acorta las barreras geográficas y hace posible el envío de semen a cualquier parte del mundo, ya que el transporte de un contenedor con muestras seminales es menos costoso que transportar una yegua, se dispone de semen continuamente en el sitio donde se encuentra la yegua. Por otro lado, permite programar una inseminación artificial cuando exista una yegua en ovulación y el semen que ha sido congelado y almacenado adecuadamente puede estar disponible por décadas (Costa et al., 2008; Hankins & Samper., 2001). El desarrollo de protocolos confiables de criopreservación permite el intercambio de semen entre diferentes subpoblaciones que son geográficamente distantes lo que ayuda a diversificar la variabilidad genética (Borque et al., 2006).

El éxito de la criopreservación celular se ha logrado gracias a la utilización de sustancias crioprotectoras que reducen la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación. Además, estas sustancias inhiben la actividad de varias enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y después de la congelación y descongelación del material seminal. Sin embargo, los crioprotectores pueden producir dos tipos de alteraciones en las células; una funcional, caracterizada por la inactivación proteica y enzimática; y otra estructural, relacionada con el estrés osmótico ocasionado por los cambios en volumen experimentados por la célula espermática (León et al., 2007; Fahy., 1986).

Algunas alteraciones son: la cristalización de los lípidos, separación de lípidos de la membrana, reordenamiento de los componentes de la membrana y la agregación de proteínas. La congelación y descongelación son condiciones de daño irreversible y son eventos inevitables con las técnicas actuales. (Celeghini et al., 2013; Ball et al., 2006).

4.2. Agentes crioprotectores

Los agentes crioprotectores (ACP) son sustancias hidrosolubles y de baja citotoxicidad que ayudan al espermatozoide a resistir la reducción de temperatura durante el proceso de criopreservación; al disminuir el punto eutéctico, la deshidratación celular se dará a

UCUENCA

una temperatura menor y el estrés osmótico será menor (García & Vila, 1984) (Boiso, 2001). Los APC se han clasificado en permeables (penetrantes) y en no permeables (no penetrantes), de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana plasmática (Boiso, 2001).

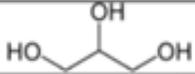
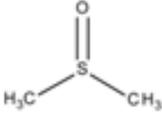
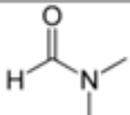
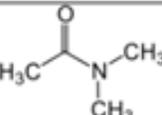
	Fórmula Química	Estructura Química	Peso Molecular (g/M)	Densidad (g/mL)
Glicerol (GLY)	$C_3H_5(OH)_3$		92.09	1.250
Etilenglicol (EG)	$(CH_2OH)_2$		62.07	1.113
Dimetilsulfóxido (DMSO)	$(CH_3)_2SO$		78.13	1.100
Dimetilformamida (DMF)	C_3H_7NO		87.12	0.937
Dimetilacetamida (DMA)	$CH_3CON(CH_3)_2$		73.09	0.944

Figura 1: Agentes crioprotectores

Fuente: (Zurita , 2019)

4.2.1. Crioprotectores no permeables

Los crioprotectores no permeables son compuestos de elevado peso molecular (180.00 g/mol) que no atraviesan la membrana plasmática, por lo que su efecto protector lo desarrollan en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos favoreciendo un medio hipertónico que hace que salga agua de la célula (deshidratación), disminuyendo así la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares.

- Azúcares: de forma natural el plasma seminal presenta una serie de azúcares como lo son la glucosa, fructosa y sorbitol. De entre ellos la glucosa y la fructosa son los azúcares más empleados en los diluyentes de congelación de semen en

UCUENCA

animales, aunque el sorbitol se utiliza también para la criopreservación de semen en el toro y en el hombre. El uso de azúcares como la metilcelulosa no ha mostrado tan buen efecto crioprotector y siempre necesita combinación con otros crioprotectores.

- Leche desnatada: las caseínas, fosfocaseínas y la beta lactoglobulinas procedentes de la leche son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al estrés por frío sirviendo la leche desnatada en polvo o entera homogeneizada como constituyente básico del diluyente o formando parte en pequeñas cantidades de diluyentes sintéticos, aunque no está clara la naturaleza de su mecanismo crioprotector.
- Yema de huevo: los fosfolípidos y lipoproteínas procedentes de la yema de huevo son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al daño desencadenado en la congelación. La yema de huevo que tradicionalmente se ha usado en los diluyentes de semen es de gallina, aunque también se ha probado de otras especies como pato con buenos resultados. (Elgueta , 2018)

4.2.2. Crioprotectores permeables

Son compuestos de bajo peso molecular (92.09 g/mol) y permeables a través de la membrana plasmática que producen una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos de esta que hace incrementar su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación actuando tanto en el medio intracelular como extracelular

Glicerol: es el crioprotector más usado, pero no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, Presenta un claro efecto negativo pudiendo ser uno de los factores implicados en la baja motilidad y fertilidad post-descongelación que ha sido descrito en aves, pero también en équidos. Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, además de provocar desnaturalización de proteínas.

El principal efecto tóxico del glicerol parece estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación, por lo que se ha propuesto el uso de crioprotectores alternativos permeables de menor peso molecular y viscosidad y mayor permeabilidad que desencadenan un menor estrés osmótico y una menor formación de cristales de hielo intracelulares (Ávila-Portillo et al., 2014).

4.3. Daños durante la criopreservación seminal

Durante la crioconservación, se produce un daño letal y subletal en los espermatozoides, bastante parecido a la apoptosis. Esto afecta la motilidad y la integridad de los espermatozoides, lo que a su vez tiene un impacto directo en su vida media y su capacidad para fertilizar (Graham, 1996; Ortega-Ferrusola et al., 2008).

Varios autores han reportado que durante la criopreservación seminal se han producido daños que se clasifican en cambios de temperatura, de osmolaridad, o a la acción de agentes oxidantes (Gutiérrez, 2014).

4.3.1. Estrés oxidativo

En el metabolismo oxidativo fisiológico de los espermatozoides se produce especies reactivas de oxígeno o "radicales libres" (ROS), que juegan un papel importante en la capacitación de los espermatozoides, la reacción del acrosoma y el mantenimiento de la capacidad de fertilización. Los problemas surgen cuando hay un desequilibrio en la producción o degradación de estas sustancias, lo que puede provocar efectos lesivos en los espermatozoides, donde se ven afectadas la membrana plasmática, el ADN o parámetros espermáticos como la motilidad (Thuwanut et al., 2010).

Tras la descongelación se forman poblaciones heterogéneas de espermatozoides anormales los cuales producen una mayor cantidad de (ROS) a diferencia de las producidas por la población de espermatozoides normales, los mismos que afectan negativamente a la población de los estructuralmente vivos o normales (Ball et al., 2000).

4.3.2. Estrés osmótico

Hasta hace unos años, la suposición generalmente aceptada entre los expertos era que la muerte de los espermatozoides durante la congelación es el resultado de la formación de cristales de hielo intracelulares esto si la tasa de enfriamiento es muy rápida, si había una exposición prolongada a ambientes hipertónicos los deshidrata en condiciones de un enfriamiento muy lento. Sin embargo, hoy se sabe mediante técnicas de evaluación avanzadas que la formación de cristales intracelulares no se produce en el espermatozoide a las velocidades de congelación que se utilizan actualmente, es así que la principal fuente de daño durante la crioconservación parece ser el estrés físico de la formación de cristales extracelulares por la exposición de en un medio hiperosmótico a los espermatozoides, es hace que haya una pérdida de líquido (H_2O) en el medio intracelular que da como resultado una pérdida de tamaño durante un periodo de tiempo hasta que haya un equilibrio en las concentraciones del medio intra y extracelular (Mazur, 1984; Morris, 2006; Peña et al., 2011).

En la descongelación se da un proceso inverso, ya que el medio extracelular recupera su osmolaridad y se da la exposición a un medio hipoosmótico en el cual el espermatozoide está expuesto a un incremento de tamaño recuperando su volumen (Sieme et al., 2008).

La suma de estos dos tipos de estrés osmótico provoca en la membrana plasmática, mitocondrias, citoesqueleto daños potenciales en las estructuras anteriormente mencionadas si se ve superada la “tolerancia osmótica espermática” la cual está entre 450-1500 mOsm/kg en el equino (Peña et al., 2011).

4.3.3. Estrés térmico

Durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides que afectan a su viabilidad debido a los cambios bruscos de temperatura, afectándose principalmente la membrana plasmática y acrosomal (Aretio León, 2006).

UCUENCA

El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con que esta ocurra. Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Aretio León, 2006).

4.4. Características generales del eyaculado equino previo a la criopreservación

En los equinos el volumen seminal sin gel varía entre 20-60 mL; esto depende del reproductor y el número de colectas que se realicen por semana. El porcentaje de motilidad se encuentra entre 60-80% y la concentración espermática oscila entre los 170 -300 millones de espermatozoides (Palma & Brem , 2016).

La evaluación in vitro del semen permite valorar las características relacionadas con la capacidad fecundante del espermatozoide como: motilidad, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática. El porcentaje de motilidad espermática se estima visualmente en un microscopio. Es la técnica más utilizada y considerada de gran valor ya que permite diferenciar el semen de baja y alta calidad (Puga-Torres et al., 2018).

4.4.1. Características espermáticas en el semen equino

Como se sabe, entre sementales la fertilidad varía, aun cuando se reúnen cualidades mínimas seminales. Se han usado varios métodos de laboratorio para la evaluación del semen, que podrían ayudar a predecir su potencial fecundante (Celis et al., 2014). Se puede mencionar que el análisis computarizado del movimiento y morfología espermática, la función mitocondrial, la peroxidación lipídica en la membrana de los espermatozoides, la composición del plasma seminal, la integridad y funcionalidad del acrosoma no son más que un conjunto de factores que deben jugar a favor del momento de un eyaculado o de una inseminación ya que son indispensables para una fecundación óptima o de buena calidad. Sin embargo, aun teniendo presente los avances, ninguna prueba de laboratorio puede estimar el potencial real de una muestra seminal de un

UCUENCA

equino o predecir su uso en un 100%, no obstante, algunos de los métodos biotecnológicos (que no son más que tinciones, sondas fluorescentes, encimas, etc) usados mejoran relevantemente el estudio del espermatozoide dando cabida a nuevos estudios aún más profundos, que puedan soportar el uso o no del semen de un equino.

4.4.2. Evaluación seminal

Los verdaderos indicadores de la fertilidad del semental son las tasas de gestación y natalidad, pero ambos son retrospectivos y están influenciados por factores independientes de la fertilidad del caballo como son la fertilidad de la hembra y el manejo reproductivo (De Leeuw et al., 1993). Por tanto, es importante tener en cuenta que la fiabilidad de la evaluación seminal como indicador de la fertilidad de un semental no es absoluta. Una baja calidad suele ser un buen indicador de subfertilidad, sin embargo, una buena calidad de semen no es garantía aceptable de fertilidad. Ningún parámetro del análisis seminal rutinario explica más del 30% de la fertilidad de dicho semen ya que en cada análisis sólo un pequeño número de espermatozoides, y sólo parte de las estructuras que lo componen, son evaluadas. Por todo ello, son numerosos los autores que resaltan la importancia de evaluar y combinar múltiples parámetros espermáticos a la hora de evaluar una muestra seminal (Morillo , 2013).

4.5. Métodos modernos de evaluación seminal

4.5.1. Análisis espermático asistido por computador (CASA®, *Computer Assisted Sperm Analysis*)

Sus desarrolladores fueron Liu y Warne en 1977 y perfeccionado por Amman y Hammerstd en 1980, este sistema nació en la universidad de Pennsylvania, el cual evalúa con mayor seguridad y objetividad lo que permite eliminar la variabilidad entre distintos observadores al igual que una valoración más exacta de las características de movilidad individual de los espermatozoides.

Este sistema computarizado basa su análisis en la captura y digitalización de imágenes sucesivas con una cámara montada en un microscopio de contraste de fase del

UCUENCA

movimiento de cada espermatozoide para interpretarse mediante un software y reflejarse en una serie de parámetros calculados matemáticamente.

Los parámetros de motilidad valorados por el sistema CASA® son los siguientes:

- *Velocidad promedio (VAP)*: velocidad de la trayectoria promedio del espermatozoide (mm/s).
- *Velocidad curvilínea (VCL)*: distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo (mm/s).
- *Velocidad rectilínea (VSL)*: velocidad del recorrido rectilíneo del punto inicial al punto final (mm/s).
- *Índice de linealidad (LIN)*: es el cociente entre la VSL y VCL (%).
- *Índice de rectitud (STR)*: es el cociente entre la VSL y VAP (%).
- *Índice de oscilación (WOB)*: es el cociente entre la VAP y VCL (%).
- *Amplitud de movimiento lateral de la cabeza (ALH)*: desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides motiles (mm/s).
- *Frecuencia de batida de flagelo (BCF)*: frecuencia de batida de flagelo de los espermatozoides motiles (Hz) (Varner, 2008).

4.5.2 Evaluación de la calidad espermática

Las evaluaciones que componen la calidad espermática son básicamente la macroscópica y la microscópica, que en conjunto permiten un diagnóstico relevante y definitivo acerca de la calidad seminal.

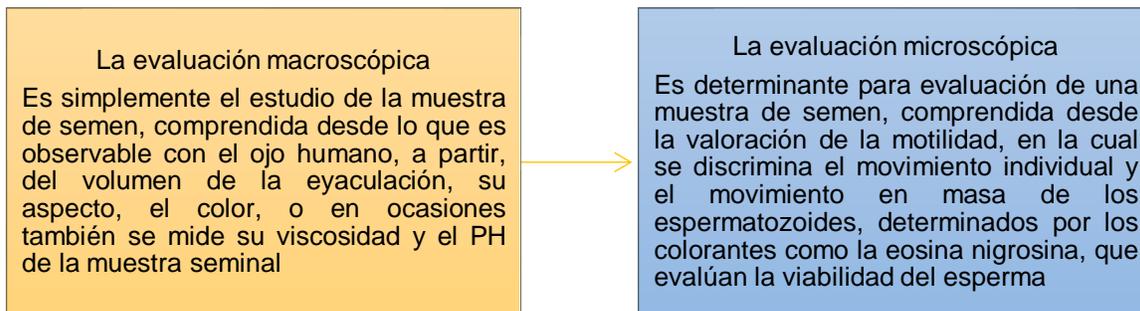


Figura 2: Evaluación de la calidad de esperma; adaptado de (Castro & González , 2018)

4.5.3 Características a medir en la evaluación espermática

En el análisis de las células espermáticas, algunas de las técnicas que han sido desarrolladas, subestiman la capacidad fecundante, que en otras palabras es la facilidad específica de un espermatozoide para llegar a fecundar, lo que hace necesario la implementación y el uso de tecnologías de análisis seminal, además de tener en cuenta los factores extrínsecos e intrínsecos a los cuales se somete el espermatozoide, lo que influye en el proceso de la fecundación por el uso de semen de gacón o padrote. Es así como las técnicas y métodos son la manera más segura, entre algunas de ellas se encuentran las microscopías fluorescentes, que permiten identificar las membranas con integridad conservada, también la microscopía electrónica de transmisión que es incluso más precisa, para identificar la capacidad fecundante del espermatozoide, y de esta manera dar la oportunidad tanto al profesional, como al propietario del caballo o la hembra para servicio a tomar una mejor decisión con respecto al semen (Castro & González, 2017; Restrepo Betancur et al., 2013)

4.5.4. Morfología espermática del semental

El semental promedio aproximadamente presenta el 50% de la morfología de espermatozoides normales, durante la temporada de reproducción (dependiendo si está o no en un país con estacionalidad climática) puede variar considerablemente, debido a esto, cada 2 o 4 semanas se debe realizar evaluaciones de rutina para determinar las características del espermatozoide del semental. Por otra parte, la presencia de células germinales en el eyaculado es motivo de preocupación, pues indica que el macho tiene problemas en madurar sus espermatozoides o que alguna enfermedad pueda estar causando la inmadurez espermática. Las directrices de evaluación en América del Norte, se desarrollan con el fin de seleccionar a los sementales que puedan realizar un 75% o más en cuanto a preñeces en un lote 40 yeguas preñadas, criado naturalmente, pero si es criado artificialmente por hay unas 120 yeguas. Dado a lo anterior, un criador eficiente debe producir un mínimo de mil millones de espermatozoides morfológicamente normales al menos por animal, además progresivamente móviles en el eyaculado, en mínimo dos muestras recogidas con una hora de (Castro & González, 2017; Restrepo Betancur et al., 2013)

4.5.5 Evaluación del volumen espermático

La valoración del volumen obtenido tras la recolección se realiza utilizando el mismo recipiente para la recogida (el filtro permite eliminar la mayor cantidad de fracción gel e impurezas) o bien tras filtrarlo y transferirlo a un recipiente escalado y atemperado.

El volumen seminal promedio obtenido esta entre los 60-100mL (Hafez & Hafez, 2000) pero no es raro obtener volúmenes tan variables entre los sementales que pueden ir desde 10mL a más de 250mL. Los factores que afectan el volumen de semen obtenido en un semental es muy variado como la raza, el individuo, la edad, la frecuencia con que se realice la recogida, la estimulación o la época del año (Brinsko et al., 2011; Pickett et al., 1970; Robinson, 2012; Thompson et al., 1977). Lo mismo ocurre con la variabilidad

UCUENCA

del volumen de gel obtenido, pudiendo estar casi ausente a estar en un volumen bastante elevado.

4.5.6 Evaluación del color y aspecto del eyaculado

La inspección visual del semen tras su recolección y filtrado es un paso importante para evaluar el color y apreciar la posible existencia de anomalías/contaminaciones.

El color normal del semen varía de blanquecino a blanco grisáceo-crema según la concentración espermática pudiendo aparecer colores u olores anormales que suelen ser indicativos de problemas (Samper & Estrada, 2007; Brinsko et al., 2011).

4.5.7 Evaluación de la concentración espermática

Los valores de concentración espermática media fluctúan entre los 150-300 millones/mL con un rango de variación muy amplio (50-800 millones/mL) (Hafez & Hafez, 2000). Está afectada por la producción espermática y por la cantidad de plasma seminal en el eyaculado.

4.5.8 Espermatozoide equino

La célula espermática equina se divide en cabeza, parte media, pieza principal y final. El espermatozoide está revestido por la membrana plasmática, compuesta por diferentes tipos de proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucolípidos y carbohidratos. También posee enzimas en el acrosoma, que actúan como la barrera principal entre el espermatozoide y el ambiente externo, debido a su característica de permeabilidad selectiva (Amann & Graham., 2011; Ball et al., 2006; Amann & Graham., 1993).

En el espermatozoide y en el plasma seminal están presentes antioxidantes, que son inhibidores de las especies reactiva de oxígeno (ROS). La principal defensa antioxidante se da por acción de la catalasa (CAT), el superóxido dismutasa (SOD), el glutatión reducido (GR) y el glutatión peroxidasa (GPx), presentes en el espermatozoide y en el

UCUENCA

plasma seminal. Estos antioxidantes contribuyen en el aumento inicial de la motilidad y de la integridad de la membrana espermática (Palma & Brem , 2016).

4.5.9 Plasma seminal.

Se puede definir al plasma como una secreción compleja la cual está compuesta por varios lípidos, azúcares, iones, sales orgánicas, enzimas y proteínas de las cuales la mayoría proviene de las glándulas sexuales accesorias, si bien es cierto el plasma seminal sirve como medio de transporte, regulador osmótico, buffer y como fuente de energía (Fumuso & Giuliano, 2016). Pero cuando el líquido seminal se va a destinar para congelación este tiene un efecto perjudicial para los espermatozoides, es por eso que se realiza la centrifugación para separarlo de los espermatozoides ya que tiene un efecto perjudicial en su capacitación. Ahora se conoce que la refrigeración y congelación con plasma seminal resulta en una menor calidad y vitalidad espermática y que los espermatozoides que se han procesado en un diluyente tendrán una calidad y fertilidad igual o superior que los espermatozoides con plasma seminal en la eyaculación. Del mismo modo se sabe que la congelación y enfriamiento transcurridas 24 horas post congelación con plasma seminal deteriora ciertos parámetros en la cinética espermática como motilidad total, motilidad progresiva y espermias rápidos en comparación con muestras que no tenían plasma seminal (Neto et al., 2013).

4.5.10 Características del semen.

El eyaculado de los equinos está compuesto por un volumen de 50 y 300 mL. Un semental eyacula una serie de 5 a 8 fracciones, la composición de cada una es variada. La primera fracción o pre espermática no contiene espermatozoides y la produce las glándulas bulbouretrales. Las próximas dos o tres eyecciones contienen más espermatozoides (fracción rica en espermatozoides) y las fracciones finales contienen pocos espermatozoides y la produce la vesícula seminal (Loomis, 2006).

4.5.11 Examen microscópico.

Después de extraído el semen de la VA se debe evitar someter a cambios bruscos de temperatura, todo el material que va estar en contacto (probetas, laminas, pipetas y diluyente) debe estar precalentado a 38- 40°C en una platina térmica y a 37°C a baño maría, la fracción gel debe ser separada lo antes posible por el efecto negativo que esta tiene sobre los espermatozoides (Duran Ramirez, s.f.).

4.5.12 Preparaciones húmedas sin teñir.

Las preparaciones húmedas sin teñir se usan por que en estas hay un menor número de artefactos encontrados al mismo tiempo se mejora la visualización. La muestra que va a ser evaluada debe ser fijada con una solución de glutaraldehído al 2% o citrato de formol y se observan las células con aceite de inmersión o con un microscopio de fase (Gutiérrez, 2014).

4.5.13 Tinciones fluorescentes.

Estas se basan en el uso de tinciones que pueden ser permeables o no permeables, para el caso del Ioduro de propidio (PI) que se trata de una tinción no permeable, esta no difunde al interior de la membrana plasmática cuando está intacta (Varner, 2008). Se pueden usar combinaciones de tinciones para incrementar la información obtenida como por ejemplo la combinación FICT-PNA + yoduro de propidio la cual brinda información de membrana plasmática más el estado del acrosoma (Graham et al., 1990). Esta prueba se caracteriza por que estos compuestos absorben energía luminosa de una longitud de onda específica para cada compuesto, para esto se usa un rayo láser generalmente de argón (Parra, 1997).

UCUENCA

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Materiales físicos

- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Caja de poliestireno Minitube®
- Etiquetas de identificación
- Vagina artificial (VA) Tipo Hannover para equinos (Ref: 11220/0145, Minitube®, Alemania).
- Manga interior (goma) para VA Hannover (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania).
- Protectores plásticos recortables y descartables (Liners)
- Botella colectora de semen para VA equina (Ref: 11231/0200, Minitube®, Alemania).
- Tapa-anillo para botella colectora para VA equina (Ref: 11231/0301, Minitube®, Alemania).
- Filtro de nailon para semen tipo Colorado (Ref: 11231/0400, Minitube®, Alemania).
- Bolsa termoprotectora para VA equina (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania).
- Rollo de papel secante
- Rollo de papel aluminio
- Termómetro digital
- Tubos Falcon de 15 mL
- Parafilm®M (Ref: P7793, Sigma-Aldrich)
- Lubricante K-Y Gel® (Ref: SKU 100021489, REBE)

5.1.2 Materiales biológicos

- Equinos (árabes)
- Eyaculados de Semen equino

5.1.3 Reactivos

- Glicerol (Ref: G9012, Sigma-Aldrich)

UCUENCA

- Dimetilformamida (Ref: D119-4, Fisher scientific, Bélgica)
- Botusemen-Special® (SKU: 550/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- Botusemen-Gold® (SKU: 008/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutinina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Bovine serum albumin, BSA (Sigma, A9418)
- Nitrógeno líquido
- Cloruro de potasio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Cloruro de magnesio heptahidratado
- Fosfato ácido de potasio
- Fosfato monobásico de sodio
- Glucosa

5.1.4 Materiales de laboratorio

- Agua milli-Q
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution 2018® , v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast, excitación entre 450-490 nm, y emisión de 520 nm)
- Pipetas de 1 – 10 μ l, 2 – 20 μ l; 20 – 200 μ l, y de 200 a 1000 μ l
- Tubos falcon 15 ml
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubreobjetos
- Nevera

UCUENCA

- Pajuelas 0,5 ml
- Esterilizador UV
- Caja Minitube®
- Rampa flotante
- Tanque de nitrógeno líquido
- Microscopio de Epifluorescencia con contraste de fases con una.
- Baño María
- Incubadora Memmert
- Temocuople Digital thermometer® con sondas sensibles tipo K (Ref 6802 II)

5.2 Metodología

5.2.1 Área de estudio

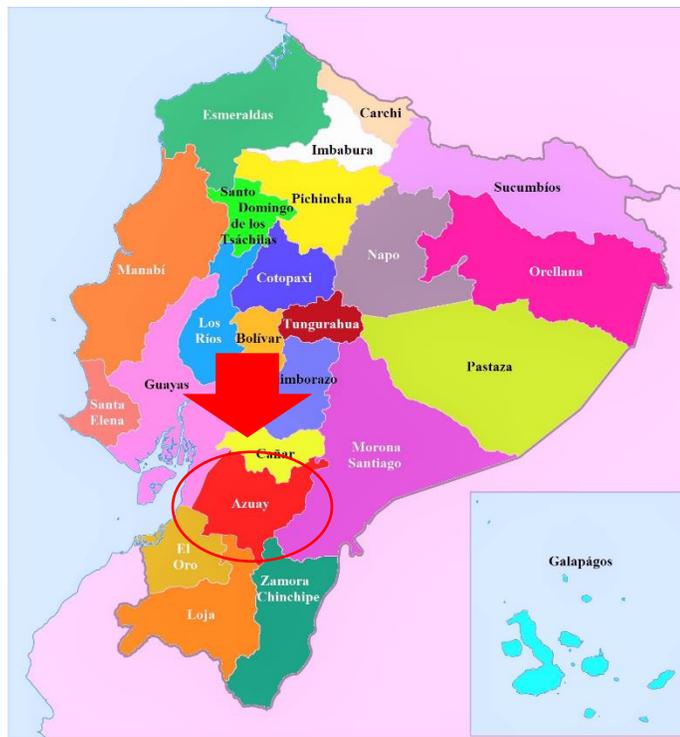


Figura 3: Ubicación del área de estudio (Cuenca-Azuay).

Fuente: (Directorio cartográfico de Google Maps, 2020).

UCUENCA

5.2.1.1 Ubicación política geográfica

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología en la granja Irquis de la universidad de cuenca la misma que se encuentra ubicada en la parroquia Victoria Del Portete a 22 km de la ciudad de cuenca. La granja, se encuentra ubicada entre las coordenadas geográficas (-3.080240, -79.075294) ; altitud de 2796 m s.n.m. La precipitación anual es de 2500 mm, con temperatura que oscila entre 3 a 11°C. La colecta del semen equino se realizó en los criaderos de raza de caballos Árabe ubicados en la provincia del Azuay (2.89741, -79.0045 2° 53) y Cañar (-2.693695, -78.932939)

5.2.2 Unidad experimental y diseño experimental

Esta investigación evaluó el efecto crioprotector de DMF, GLY y su combinación DMF-GLY en la criopreservación de esperma equino. Para este propósito, se utilizó 24 eyaculados de semen provenientes de 4 caballos árabe (dos colectas semanales por caballo, 6 sesiones de recolección; y 6 eyaculados / caballo). Cada eyaculado se pre-diluyó inicialmente 1: 1 (10:10 mL, v/v) con el diluyente Botusemen-Special® atemperado a 37°C y se transportó al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. En el laboratorio, cada muestra diluida fue centrifugada a 300 g x durante 10 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en 3 mL con Botusemen-Gold® (muestra stock). Con esta muestra stock se conformaron 3 tratamientos al ser diluidos con Botusemen-Gold® a una concentración final de 50×10^6 esp/mL y adicionado los siguientes crioprotectores penetrantes:

- T1 = DMF al 5%
- T2 = GLY al 5%
- T3 = DMF-GLY al 3% - 3% respectivamente.

Las muestras fueron equilibradas durante 75 minutos a 5°C, cargadas en pajuelas de 0,50 mL y congeladas en vapores de nitrógeno líquido estático. Las muestras espermáticas frescas-diluidas y criopreservadas de los tres tratamientos fueron

UCUENCA

analizados sus parámetros cinéticos e integridad de las membranas plasmática y acrosomal mediante el sistema CASA (SCA®) y la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC. Un total de 120 pajuelas (40 / tratamiento) consideradas como unidades experimentales, fueron analizadas su criosupervivencia de acuerdo a los análisis detallados anteriormente.

La variable independiente en esta investigación corresponde al crioprotector (DMF, GLY y DMF-GLY); y las variables de salida o dependientes son los parámetros cinéticos (motilidades, velocidades, parámetros de relación y movimiento de cabeza y cola) e integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal)

5.2.3 Metodología para la investigación

5.2.3.1 Reproductores y recolección de semen.

El proceso de recolección de semen se realizó en cuatro caballos árabes sexualmente adultos, clínicamente sanos pertenecientes a una finca del cantón Paute provincia del Azuay (-2.762250, -78.733717) y una finca del sector Burgay provincia del Cañar (2.693695, -78.932939). Las fincas “San Alfonso (Burgay) y San Juan (Paute)” fueron certificados por Agrocalidad como predios libres de Anemia Infecciosa Equina (AIE). Su calendario de desparasitación se lleva a cabo cada tres meses. Después de su entrenamiento semanal son administrados un complejo vitamínico. Los reproductores no presentaron enfermedades del tracto reproductor ni en general. El entrenamiento consistió en actividades físicas tres días a la semana.

El proceso de recolección de semen se realizó dos veces por semana (2 eyaculado / semana / caballo) usando una vagina artificial (VA) tipo Hannover. La VA fue armada, lubricada y acondicionada a una temperatura entre 45 y 50°C, de tal modo que al momento de la colecta se encuentre entre 38 a 39°C. El envase de recolección estuvo dotado de un filtro para retener la fracción gelatinosa pobre en espermatozoides. Previo a la colecta se realizó un lavado del pene con suero fisiológico precalentado a 37°C para limpiar el esmegma. Inmediatamente después de la recolección, cada eyaculado fue pre-diluido en una fracción 1:1 (10 mL) con cada diluyente base Botusemen-Special® previamente atemperado a 37°C. Inmediatamente las muestras fueron transportadas al

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal (en un tiempo máximo de 2 horas) a temperatura ambiente, para su análisis inicial subsiguiente, procesamiento y criopreservación.

5.2.3.2 Concentración y procesamiento del semen

En el laboratorio, el primer análisis consistió en la determinación de la concentración usando la cámara de Neubauer. Para este propósito se usó una dilución 1:200 entre semen crudo-filtrado y solución salina formolada (3 μL semen crudo en 600 μL de solución salina formolada). De esa mezcla se tomó 10 μL y se colocó en la cámara de Neubauer recubierta por un cubreobjetos y se contará los 5 cuadrantes observados en un microscopio bajo un aumento de 40X. El conteo espermático fue multiplicado por 10^7 (constante) y el valor será expresado en millones (Fig. 4)

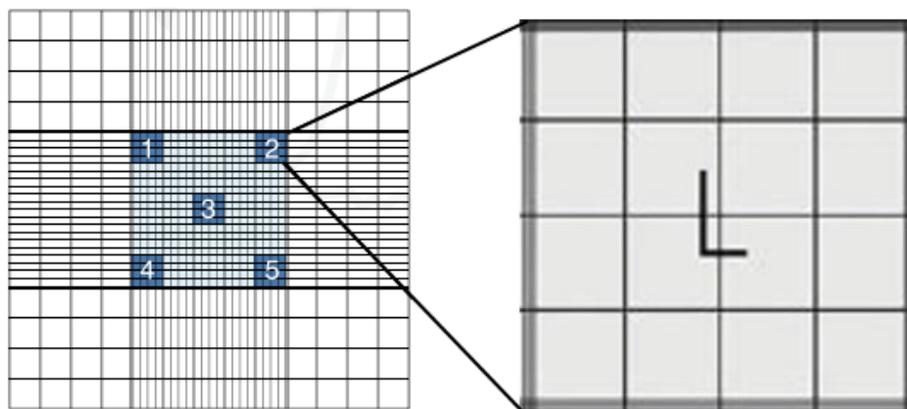


Figura 4: Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides (Montoya, 2009)

Consecuentemente, la motilidad inicial, así como los parámetros cinéticos fueron medidos en el sistema CASA (Ver sección de análisis de calidad espermática).

Cada muestra espermática pre-diluida 1:1 de cada eyaculado fue centrifugado a 300 x g durante 10 minutos y el pellet obtenido fue re suspendido a 3 mL usando el diluyente Botusemen-Gold® a temperatura ambiente. Esta muestra de 3 mL se denominó “muestra stock”. Cada muestra stock fue suficiente para conformar los tres tratamientos de tal modo que en tres tubos falcon de 15 mL se preparó un volumen final de 2 mL para cada tratamiento usando el mismo diluyente Botusemen-Gold® adicionado los crioprotectores

UCUENCA

de T1, T2 y T3, respectivamente a una concentración final de 50×10^6 esp/mL. Los tres tubos falcon correspondientes a los tres tratamientos fueron mantenidos en equilibrio a 5°C durante 75 minutos previo a su congelación.

5.2.3.3 Congelación, nucleación de hielo y descongelación de semen

Las muestras equilibradas fueron cargadas en pajuelas de 0,50 mL y selladas con alcohol de polivinilo. El protocolo de congelación se realizó mediante vapores de NL_2 estático contenido dentro de una caja metálica Minitube® la cual consta de una caja externa de material aislante de poliestireno, una caja interna de acero inoxidable y una rampa flotante. Para la congelación se usó la rampa flotante sobre el nivel del NL_2 . Las pajuelas se colocaron en dicha rampa de manera horizontal a una altura de 5 cm del nivel del NL_2 durante 10 minutos y finalmente, las pajuelas se sumergirán dentro del NL_2 .

La determinación del momento de la nucleación de hielo y la disipación del calor latente de fusión se realizó en la congelación de cada tratamiento. Este proceso consistió en introducir un sensor de temperatura de alambres finos (termopar) en el interior de una pajuela. Una vez ingresado el sensor, se selló con parafilm para evitar fugas durante la congelación. Esta pajuela fue colocada junto con las otras pajuelas durante las rampas de congelación siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente (en las dos rampas de congelamiento). Este sensor de temperatura está acoplado a una Termocupla Digital (thermometer® tipo K, Ref 6802 II) y se registró el descenso de temperatura por unidad de tiempo; es decir, cada segundo se midió el descenso de temperatura hasta llegar a -160°C . El momento de la nucleación de hielo y el calor latente fusión fue evidenciado durante el rango crítico de temperatura (-5 a -25°C) cuando la termocupla muestre un ascenso progresivo y la disipación del calor latente de fusión duró hasta que nuevamente se retome la temperatura de descenso.

La descongelación se realizó a los 30 días de su congelación, sumergiendo las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 30 segundos. Las muestras congeladas-descongeladas

UCUENCA

de cada tratamiento fueron evaluadas su cinética e integridad de las membranas espermáticas

5.2.3.4 Análisis de calidad espermática

5.2.3.4.1 Cinética espermática

Las características cinéticas de las muestras de esperma equino fresco y congelado-descongelado de cada tratamiento fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Para la evaluación se tomó 5 μ L de la muestra por tratamiento y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinemáticas evaluadas fueron: 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), Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m).

5.2.3.4.2 Integridad de membranas espermáticas

Para la evaluación de las membranas, se descongeló el medio Hepes (250 μ L). La tinción de fluorescencia fue preparada mezclando una dosis (100 μ L) de yoduro de propidio (PI) más una dosis de PNA-FITC aglutinina (100 μ L) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta su uso. Al medio Hepes descongelado y atemperado a 22°C se adicionó a la muestra de esperma a analizar alcanzando una concentración de 10 x10⁶ espermatozoides/mL.

Sin luz, se agregó 5 μ L de la mezcla de fluorescencia (PI / PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 μ L de esa muestra y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser

UCUENCA

evaluado en el microscopio de fluorescencia (Galarza et al., 2018). La viabilidad de los espermatozoides y el estado de la membrana acrosómica se analizó mediante microscopía de fluorescencia (contando 200 células), utilizando un microscopio 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.). 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 y acrosoma dañados (DPDA,%). Adicionalmente, con estas subcategorías se calculó los porcentajes de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra, equivalente a viabilidad (IMP = IPIA + IPDA) y con membrana acrosomal íntegro (IMA = IPIA + DPIA).

5.2.3.4.3 Estrés osmótico

El estrés osmótico se evaluó en las muestras espermáticas de los tres tratamientos antes y después de la congelación. Para ello, se colocó 100 μ L de glutaraldehído al 2% (v/v) disuelto en medio PBS (Tabla 4) en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se agregó 10 μ L de cada muestra espermática antes y después de la congelación. Se tomó 5 μ L de cada muestra fijada en glutaraldehído sobre un porta y cubre objetos. Las muestras fueron evaluadas en un microscopio de contraste de fases a 40 X de magnificación. Se contó 200 células y se determinó el porcentaje espermatozoides con colas enrolladas (colas látigo).

5.2.3.5 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y, posteriormente, fueron analizados estadísticamente utilizando el software STATISTICA versión 12.0., (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Los datos están expresados como valores promedios \pm SEM (error estándar de la media). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos y aquellos que

UCUENCA

no siguieron una distribución normal ($P > 0,05$) fueron transformados a *Arcoseno* (porcentajes) y *Log-10* (numéricos) antes de su análisis estadístico. Un ANOVA unidireccional fue utilizado para evaluar el efecto de los tratamientos (T1, T2 y T3) según los crioprotectores usados, antes después de la criopreservación (fresco y descongelado) considerando al reproductor como co-variable. El efecto de los tratamientos sobre en las variables cinéticas, de integridad de membranas espermáticas y estrés osmótico fue evaluado antes y después de la criopreservación. Cuando ANOVA reveló un efecto significativo de los distintos factores ($P > 0,05$), los tratamientos fueron comparados mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Nucleación de hielo y disipación del calor latente de fusión

Los cursos de tiempo y temperatura interna medida dentro de las pajuelas (línea azul) en los diferentes protocolos de congelación usando glicerol (T1), DMF (T2) y DMF-GLY (T3) denotan en las Figuras 5 – 7. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación de hielo) dentro de las pajuelas se muestran en los recuadros pequeños (línea roja) de cada protocolo de congelación.

El tratamiento T1 que incluyó al DMF como ACP registró una nucleación del hielo (*seeding*) de $-7,8^{\circ}\text{C}$. El inicio de la nucleación del hielo ocurrió a 13 s de haber iniciado el protocolo de congelación y la duración aparente de la disipación del calor latente de fusión terminó a los 23 s (Total: 10 s). Este protocolo de congelación produjo una velocidad inicial de enfriamiento de $34^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $+5^{\circ}\text{C}$ hasta $-7,8^{\circ}\text{C}$ (hasta la nucleación de hielo), seguido de una velocidad de enfriamiento promedio de $35,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $-7,8^{\circ}\text{C}$ hasta $-100,4^{\circ}\text{C}$ (Figura 5).

El tratamiento T2 que incluyó al GLY como ACP registró una nucleación del hielo (*seeding*) de $-13,8^{\circ}\text{C}$. El inicio de la nucleación del hielo ocurrió a 15 s de haber iniciado el protocolo de congelación y la duración aparente de la disipación del calor latente de fusión terminó a los 18 s (Total: 3 s). Este protocolo de congelación produjo una velocidad inicial de enfriamiento de $63,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $+5^{\circ}\text{C}$ hasta $-13,8^{\circ}\text{C}$ (hasta la nucleación de hielo), seguido de una velocidad de enfriamiento promedio de $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $-13,8^{\circ}\text{C}$ hasta $-110,2^{\circ}\text{C}$ (Figura 6).

El tratamiento T3 que incluyó a la combinación de DMF-GLY como ACPs registró una nucleación del hielo (*seeding*) de -9°C . El inicio de la nucleación del hielo ocurrió a 11 s de haber iniciado el protocolo de congelación y la duración aparente de la disipación del calor latente de fusión terminó a los 17 s (Total: 6 s). Este protocolo de congelación produjo una velocidad inicial de enfriamiento de $49^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $+5^{\circ}\text{C}$ hasta -9°C (hasta la nucleación de hielo), seguido de una velocidad de enfriamiento promedio de $46,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -9°C hasta -128°C (Figura 7)

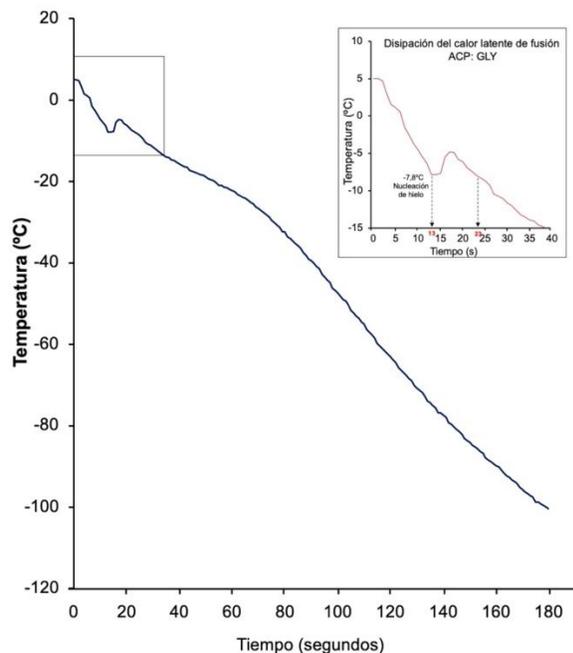


Figura 5: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T1 congeladas con DMF. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja)

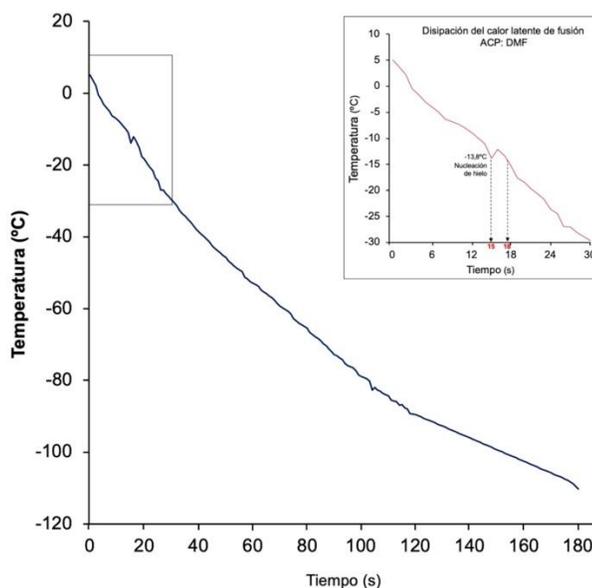


Figura 6: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T1 congeladas con GLY. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce

el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja).

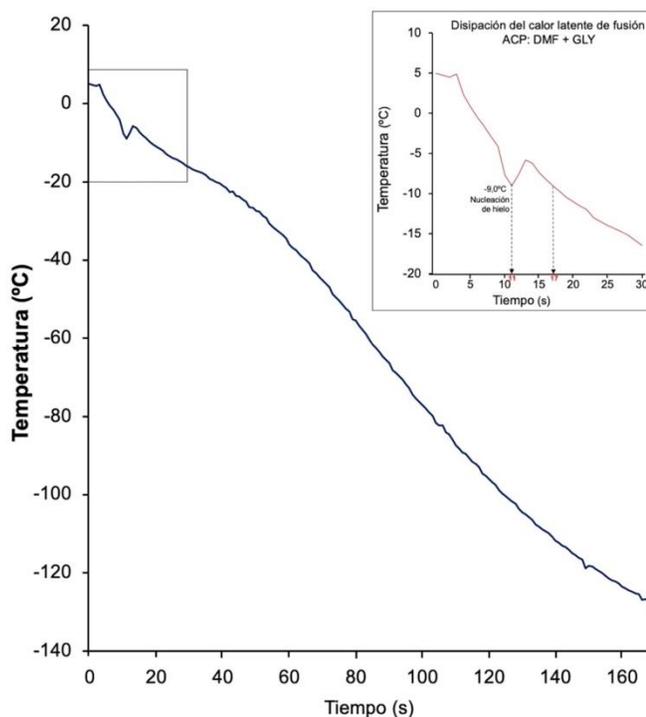


Figura 7: Evolución del tiempo y temperatura (línea azul) medida en el interior de las pajuelas del tratamiento T7 congeladas con DMF-GLY. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño (línea roja).

El análisis de las curvas de congelamiento que incluyó las velocidades iniciales de enfriamiento, la nucleación de hielo y la duración de la disipación del calor latente de fusión demostró que las muestras congeladas con el Tratamiento 1 usando al DMF como ACP, obtuvo una nucleación a menor temperatura ($-7,8^{\circ}\text{C}$) con una mayor duración de la disipación del calor latente de fusión (10 segundos). Asimismo, la congelación con T1 demostró una menor velocidad de enfriamiento durante y alrededor de la nucleación de hielo, en comparación con los tratamientos T2 y T3 ($34^{\circ}\text{C}/\text{min}$ vs. $63,5$ y $49^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente).

UCUENCA

Estos resultados sugieren que los tratamientos que usan DMF (T1 y T3) producen una menor velocidad de enfriamiento en comparación con el GLY. Esto significa que T1 produjo una respuesta de criolesión más baja que se puede atribuir a la velocidad de enfriamiento inicial y después de la nucleación de hielo (34 a 35 °C/min) que podría ser lo suficientemente rápida como para minimizar la exposición a los efectos nocivos de las soluciones hipertónicas extracelulares descongeladas durante este rango crítico de temperatura y donde el crecimiento de hielo se produce (Galarza et al., 2019).

Por el contrario, el GLY produce mayor criolesión a los espermatozoides debido a las altas velocidades de enfriamiento (63,5°C/min) durante y alrededor de la nucleación de hielo; esto significa que los espermatozoides no tienen tiempo para una deshidratación eficiente y pueden sufrir lesiones graves en el citoplasma debido a la formación de hielo intracelular letal para la célula (Mazur et al., 1978; Grötter et al., 2019). Nuestros resultados son consistentes a lo mencionado anteriormente obteniendo un menor porcentaje de motilidad y viabilidad con GLY en comparación con DMF solo o en combinación con GLY (DMF-GLY).

Algunos trabajos han sido desarrollados para la congelación de espermatozoides equinos que incluyen ACP y curvas de congelamiento, ya sea en congeladores programables o cryo-box. (Clulow et al. 2008) congeló espermatozoides de caballo en pajuelas de 0,5 y 0,25 mL usando una concentración final de GLY al 4% y no encontró diferencias en la calidad espermática in vitro posterior a la descongelación. Sin embargo, el uso de un congelador con velocidad inicial de enfriamiento programable (50°C/min) fue más efectivo en la criosupervivencia espermática, en comparación con el uso de cryo-box. Por otro lado, (Oldenhof et al. 2017) demostró que usando bajas concentraciones de DMF y unas velocidades de congelamiento aceleradas (7°C/min y 50°C/min) se obtiene una mejor motilidad, viabilidad y menor estrés osmótico en comparación con los otros ACP como el GLY, DMSO y ETG. Asimismo, (Moore et al. 2006) demostró que los espermatozoides equinos se pueden criopreservar con éxito cuando se utilizan velocidades de enfriamiento de entre 5°C y 45°C/min. Sin embargo, los autores determinaron que cuando el diluyente de congelación contenía un 4% de crioprotector, el GLY fue el más efectivo que ETG y DMF.

6.2. Motilidad y cinética espermática

El análisis de factores demostró que la MT (%) y MP (%) mostraron diferencias significativas ($P=0,0001$) en los factores: tratamientos, el tipo de semen y reproductores. Tanto la MT como la MP, fueron afectados por el proceso de criopreservación, evidenciando una reducción significativa de sus porcentajes ($P<0,001$). Después del proceso de congelación-descongelación, los porcentajes de MT y MP de los tratamientos T3 (MT= $54,2\pm 2,25\%$ y MP= $28,4\pm 1,76\%$) y T1 (MT= $53,2\pm 1,80\%$ y MP= $25,1\pm 1,42\%$) fueron más altos ($P<0,01$) en comparación con el tratamiento T2 (MT= $41,4\pm 2,35\%$ y MP= $16,1\pm 1,50\%$) (Figura 8).

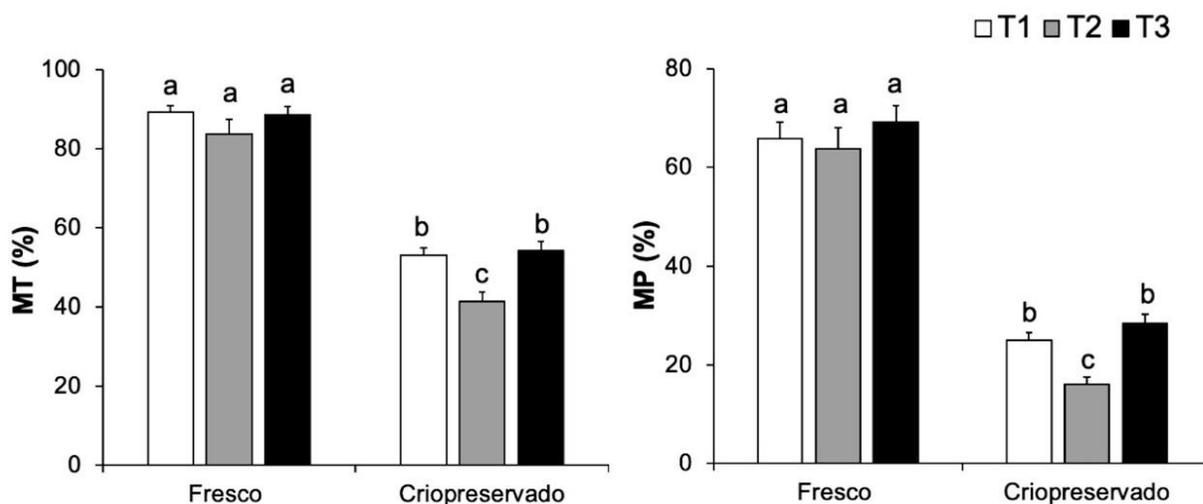


Figura 8: Motilidad total (MT, %) y Motilidad progresiva (MP, %) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P<0,001$; b-c, $P<0,01$).

Asimismo, las velocidades curvilíneas (VCL, $\mu\text{m/s}$), rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) y promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) mostraron diferencias significativas ($P<0,001$) en sus efectos principales: tratamiento, el tipo de semen y reproductores. Además, el análisis de factores evidenció una interacción significativa ($P=0,0116$) en la VSL entre los factores: *tratamientos x tipo de semen*. Todas las velocidades sufrieron una reducción significativa ($P<0,001$) de sus valores después de proceso de congelación y descongelación. La VCL

post-descongelación fue mayor ($P < 0,01$) con los tratamientos T3 ($58,0 \pm 1,71 \mu\text{m/s}$) y T1 ($54,0 \pm 1,58 \mu\text{m/s}$) comparado con el tratamiento T2 ($42,3 \pm 1,60 \mu\text{m/s}$). Sin embargo, eficientemente, la VSL y VAP de las muestras congeladas-descongeladas con el tratamiento T3 mostraron valores más altos ($P < 0,05$) de (VSL= $29,9 \pm 0,90 \mu\text{m/s}$ y VAP: $37,3 \pm 1,13 \mu\text{m/s}$) que aquellos criopreservados con los tratamientos T1 (VSL= $24,5 \pm 0,73 \mu\text{m/s}$ y VAP: $31,1 \pm 0,92 \mu\text{m/s}$) y T2 (VSL: $24,0 \pm 1,00 \mu\text{m/s}$ y VAP: $28,8 \pm 1,12 \mu\text{m/s}$) (Figura 9).

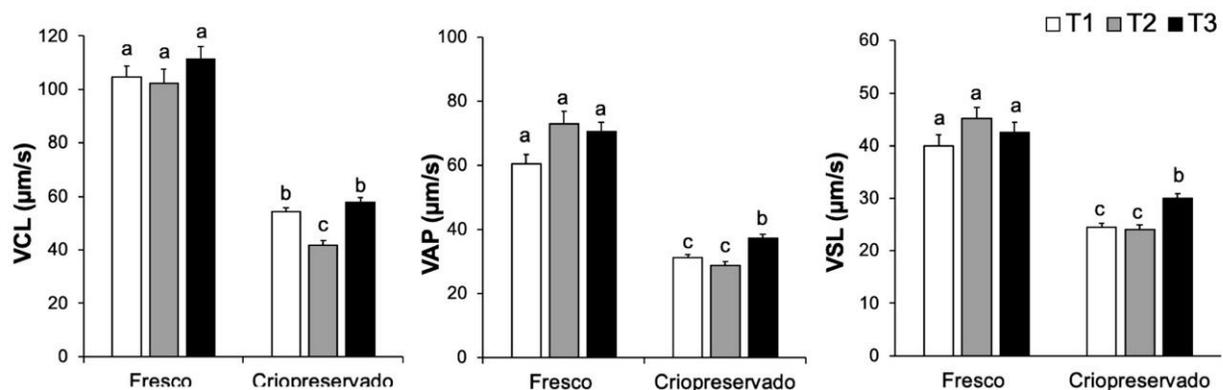


Figura 9: Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$) y rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,001$; b-c, $P < 0,01$).

El análisis de los efectos principales de los parámetros de progresión mostró diferencias significativas en: Rectitud (STR, %): caballo ($P = 0,0000$); Linealidad (LIN, %): tratamiento ($P = 0,0018$), tipo de semen ($P = 0,0000$), reproductor ($P = 0,0121$) y la interacción entre *tratamiento X reproductor* ($P = 0,0165$). El porcentaje de STR incrementó ($P < 0,001$) después de la criopreservación en todos los tratamientos sin evidenciar diferencias significativas entre tratamientos (Fresco, T1= $64,3 \pm 1,87\%$; T2= $61,1 \pm 1,76\%$; y T3= $59,7 \pm 2,24\%$ vs. criopreservado, T1= $71,6 \pm 0,74\%$; T2= $71,1 \pm 0,98\%$; y T3= $72,8 \pm 0,78\%$). El porcentaje de LIN, sin embargo, sólo incrementó con el tratamiento T3 después de la congelación. Además, los porcentajes de LIN y WOB post-descongelación

fueron mayores ($P < 0,001$) después de congelar tanto con el tratamiento T2 como T3, en comparación con T1 (Figura 10).

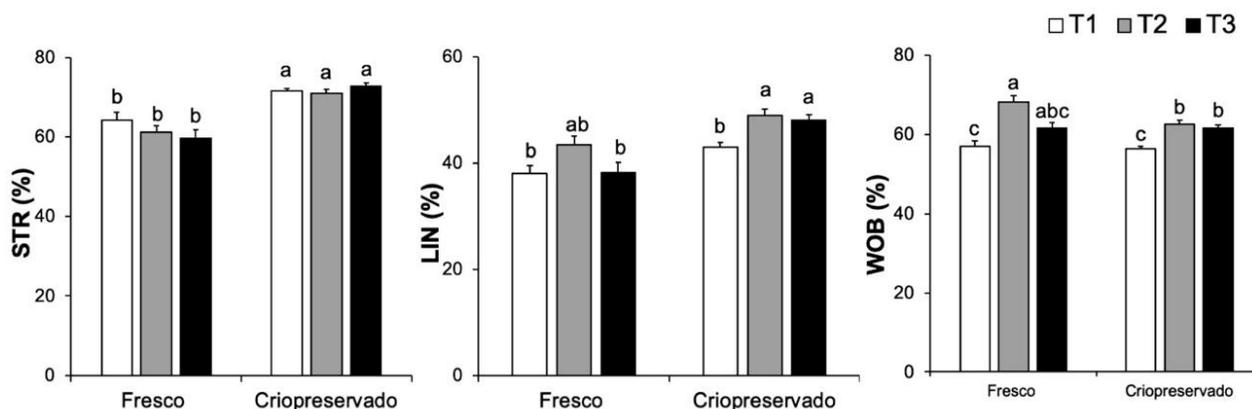


Figura 10: Índice de rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %) y oscilación (WOB, %) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,001$; b-c, $P < 0,01$).

Los efectos principales de ALH (μm) y BCF mostraron diferencias significativas ($P = 0,0000$) en los tratamientos, tipo de semen y reproductores. Además, se evidenció una interacción significativa ($P = 0,0379$) entre los factores *tratamiento X tipo de semen*. Tanto la ALH como la BCF redujeron ($P < 0,003$) significativamente sus valores después de la criopreservación en todos los tratamientos: en ALH en T1= de $3,9 \pm 0,16$ a $2,3 \pm 0,06$ μm ; T2= de $3,5 \pm 0,19$ μm a $1,7 \pm 0,05$ μm ; y de T3= $4,0 \pm 0,15$ μm a $2,25 \pm 0,05$ μm . En BCF en T1= de $10,7 \pm 0,42$ Hz a $8,5 \pm 0,20$; de T2= $9,0 \pm 0,47$ a $6,4 \pm 0,22$; y T3= de $10,7 \pm 0,45$ a $8,4 \pm 0,22$ Hz. Finalmente, los valores de ALH y BCF post-descongelación fueron más altos ($P < 0,01$) en las muestras congeladas con T1 y T3 comparado con aquellas muestras congeladas con T2 (Figura 11).

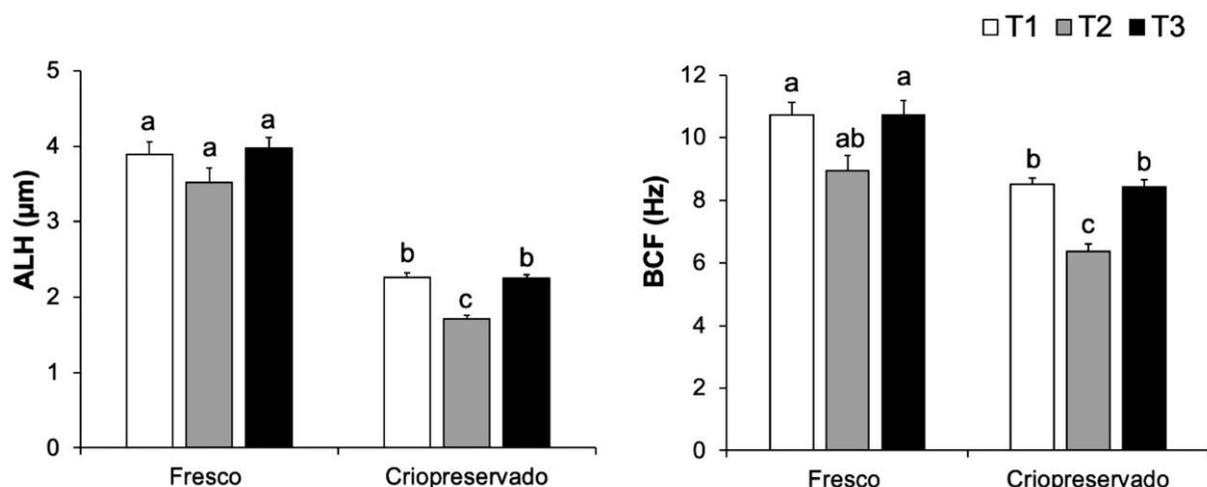


Figura 11: Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm) y frecuencia de batida de flagelo (BCF, Hz) de las muestras frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,001$; b-c, $P < 0,01$).

La criopreservación y uso de semen equino ha ganado una gran importancia y aceptación por parte de importantes asociaciones de razas de caballos (Árabe, Cuarto de milla y American Paint). Esto ha estimulado la investigación sobre protocolos para congelar semen de caballos. Sin embargo, se ha estimado que solo entre el 30 y el 40 % de los sementales producen semen adecuado para la crioconservación, y también se ha observado una variación constante en la capacidad de congelación del esperma entre las razas.

Los ACP penetrantes son generalmente más efectivos que los CPA no penetrantes debido al efecto sobre varias propiedades del medio de congelación y la célula. Primero, los ACP penetrantes reemplazan el agua dentro de la célula. Esto deshidrata la célula y los compuestos inhiben la formación de hielo intracelular. Además, estos ACP aumentan el volumen de los canales descongelados (*veins*) entre los cristales de hielo extracelulares, aumentando así el espacio disponible para las células. Asimismo, los CPA disminuyen la concentración de sal en la solución descongelada (Meryman, 2017). Sin embargo, debido a que todas las moléculas atraviesan la membrana plasmática celular más lentamente que el agua, los ACP inducen cambios transitorios en el tamaño de las

UCUENCA

células impulsados somáticamente que pueden dañar una célula (Hammerstedt, R H; Nolan, 1990). Por otro lado, la toxicidad química del crioprotector también provoca daños en los espermatozoides (Gao et al., 1995). Por tanto, la concentración y el tipo de CPA influyen en el éxito de la criopreservación (Fernández-Santos et al., 2006; Watson & Holt, 2001). En nuestro estudio estudiamos la concentración de DMF al 5% y su combinación con el GLY (DMF-GLY al 3 y 3%, respectivamente) y lo comparamos con el ACP convencional, el GLY (solo a 5%). Los resultados demostraron que la combinación fue más adecuada para proteger a los espermatozoides y obtener una mayor motilidad y cinemática en los espermatozoides equinos después de la descongelación.

Se han realizado algunos intentos para determinar los efectos benéficos y crioprotectores de las amidas en reemplazo del glicerol. (Graham 2000) en un primer intento de criopreservar con amidas congeló 10 eyaculados de 10 caballos, utilizando una concentración fija de 0,55 M de glicerol (GLY), acetamida, metilacetamida (MA), formamida (FM), metilformamida (MF) o dimetilformamida (DMF). Se observó una mejor motilidad post-descongelación del glicerol (60%) frente a todas las amidas (8%, 20%, 5%, 40% y 37%, respectivamente). En este estudio se demostró que la acetamida fue tóxica y tuvo un efecto crioprotector deficiente. Más tarde, (Graham, 2000) comparó DMF, MF, GLY y ETG, y obtuvo una motilidad post-descongelación similar a la de GLY(52 %, 48 %, 49 % y 40 %, respectivamente, para el semen congelado con GLY, MF, DMF y EG). Estos estudios iniciales, determinaron que se debe optimizar la concentración final de las amidas, especialmente de la DFM para lograr un efecto crioprotector y una motilidad aceptable. En este mismo sentido, (Alvarenga et al.,2000) utilizó semen de 10 eyaculados de 10 caballos congelados con el diluyente INRA 82 que contenía 0,55 M de GLY; 0,9 M de ETG; 1 M de DMSO o 0,6 M de DMF, obteniendo una motilidad (evaluado por sistema CASA) del 42 %, 40 %, 25 % y 50 % para GLY, EG, DMSO y DMF, respectivamente. A este punto, los resultados de motilidad post-descongelación fueron más deseables con DMF. Asimismo, (Squires et al., 2004) también demostraron que la utilización de 0,9 M de MF, DMF y ETG produjeron una motilidad post-descongelación similar al 0,55 M de GLY. Los resultados del presente estudio son consistentes a los resultados obtenidos en los

UCUENCA

estudios mencionados anteriormente, mostrando una MT y MP superior cuando el semen fue usado con DMF y DMF-GLY en comparación con el glicerol solo.

La combinación de GLY al 1%, 3% y 5% y DMF al 1% y 3% no proporcionó ninguna mejora con respecto al uso de GLY solo en la calidad de congelación del semen equino (Vidament et al., 2002). En un experimento similar, utilizando un eyaculado de 20 sementales de diferentes razas (Madeiros et al. 2002), se demostró que los espermatozoides congelados solo con DMF tenían una mayor motilidad ($p < 0,05$) que cuando se congelaban con otros crioprotectores añadidos a DMF. Sin embargo, los espermatozoides congelados con una combinación de diferentes amidas tenían una mayor motilidad que los congelados con GLY solo. La MT y MP fueron 48% y 19%, 57% y 19%, 59% y 18%, 38% y 16% para semen congelado en diluyentes con 1,5% DMF+ 3,5% GLY, 3,5% DMF+ 1,5% GLY, DMF 5 % y GLY 5%, respectivamente. Estos resultados sugieren que las altas concentraciones de la combinación entre DMF y GLY resulta ser tóxico para los espermatozoides equinos congelados y descongelados. Algunos estudios han revelado una mejora significativa de la fertilidad del semen de semental congelado con DMF en comparación con GLY (Medeiros, 2003; Moffet et al., 2003). Por el contrario, los espermatozoides equinos congelados usando GLY como crioprotector mostraron mayores porcentajes de espermatozoides móviles y progresivamente móviles en comparación con los espermatozoides congelados usando DMF (Moore et al., 2006). El uso de MF y DMF protege a los espermatozoides equinos del daño criogénico con tanta eficacia como GLY (Squires et al., 2004). Otros experimentos no mostraron diferencias en las tasas de fertilidad de las yeguas inseminadas con semen congelado con diluyentes que contenían DMF o GLY. Por ejemplo, yeguas inseminadas artificialmente obtuvieron un resultado tasas de preñez del 46 % y 50 % para el semen procesado con diluyentes de congelación que contenían 2 % de GLY o 2 % de DMF, respectivamente (Vidament et al., 2002) no encontró diferencias significativas post-descongelación en la motilidad total, la motilidad progresiva, la viabilidad, el potencial de membrana mitocondrial y la integridad del acrosoma de los espermatozoides en el presente estudio con el uso de GLY al 3,5 % y al 5 % y MF o DMF al 1, 3 y 5%.

Todos estos reportes han mostrado resultados contradictorios y se sugiere que cada caballo reproductor se podría ajustar el ACP más idóneo para su criopreservación. Los resultados de este estudio, en concordancia con los mencionados anteriormente, sugieren que las concentraciones de 3% de GLY + 3% de DMF proporcionan los mejores resultados de motilidades, velocidades y parámetros de relación y progresividad.

6.3 Integridad de las membranas plasmática y acrosomal

Los resultados de la integridad simultánea de la membrana plasmática y acrosomal demostraron diferencias significativas en los siguientes efectos principales: IPIA(%)= tratamiento (P= 0,0000), tipo de semen (P= 0,0000), reproductor (P= 0,0015), y una interacción significativa (P= 0,0106) entre los factores *Tratamiento X tipo de semen*; IPDA (%)= tipo de semen (P=0,0000); DPIA (%)= tratamiento (P=0,0000) y tipo de semen (P= 0,0002); DPDA (%)= tipo de semen (P=0,0000); IMP (%)= tratamiento (P= 0,0000), tipo de semen (P= 0,0000), reproductor (P= 0,0030), y una interacción significativa (P= 0,0221) entre los factores *Tratamiento X tipo de semen*: y finalmente en IMA (%)= tipo de semen (P= 0,0000).

Con respecto al análisis de los porcentajes de las distintas categorías de integridad de membranas espermáticas (evaluados con marcadores fluorescentes (PI/PNA-FITC) se muestran en la Figura 5. Todas las subcategorías de integridad de membrana plasmática fueron afectadas por los mismos efectos deletéreos de la criopreservación; por un lado, la subcategoría IPIA (%) redujo (P<0,001) sus porcentajes independientemente de los tratamientos, y por otro lado, las subcategorías IPDA (%), DPIA (%) y DPDA (%) incrementó (P<0,01) sus porcentajes indeseables después del proceso de congelación-descongelación. El porcentaje de IPIA post-descongelación fue mayor (P< 0,001) en las muestras congeladas con los tratamientos T3 y T1 (55,0±1,07% y 49,6±0,94 %, respectivamente) comparados con el tratamiento T2 (38,6±0,98%). En el resto de subcategorías indeseables DPIA y DPDA, sus porcentajes después de la descongelación fueron menores (P<0,05) en los tratamientos T3 y T1 que aquellos porcentajes de T2 (Figura 12).

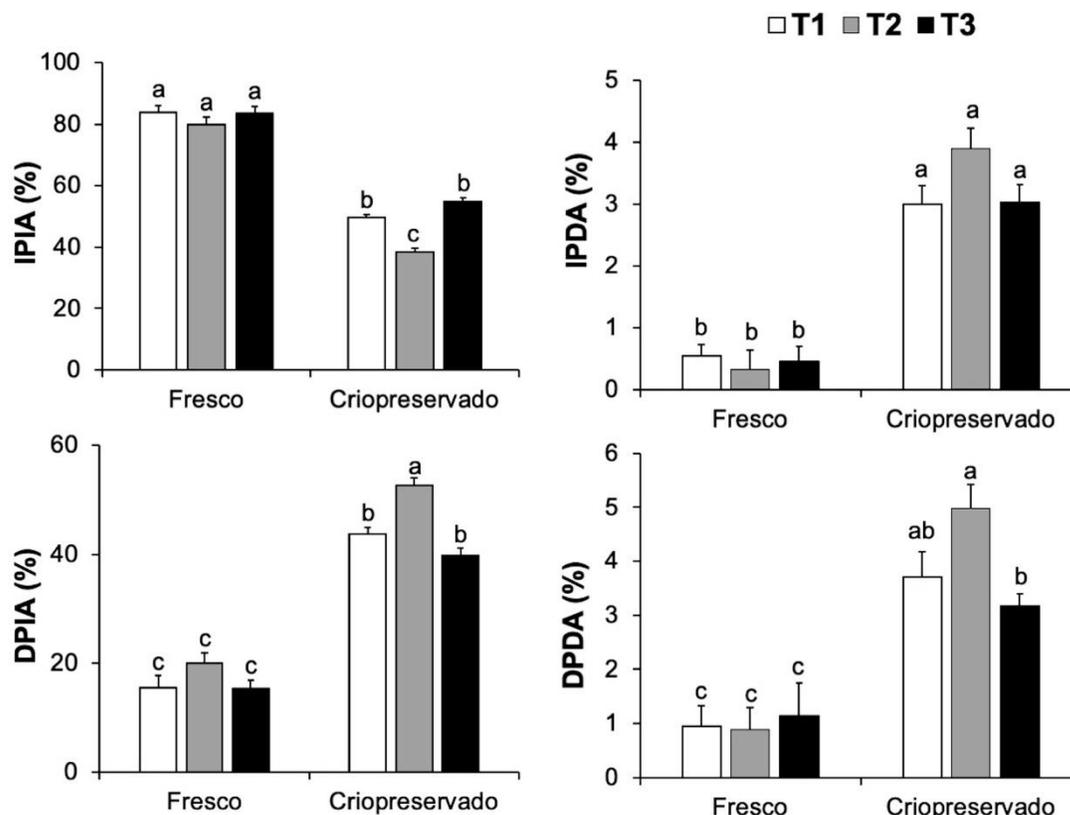


Figura 12: Porcentajes de espermatozoides en las distintas categorías de integridad de la membrana (evaluadas con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,001$; b-c, $P < 0,01$).

De la misma manera, el IMP (%) e IMA (%) disminuyeron ($P < 0,001$) después de la criopreservación en comparación con sus contrapartes frescos. La IMP post-descongelación, equivalente a la viabilidad, fue más alto en las muestras congeladas con T3 ($58,0 \pm 1,11$) que en aquellas muestras congeladas con T1 ($52,6 \pm 0,99\%$, $P < 0,01$) y T2 ($42,5 \pm 1,07\%$, $P < 0,001$). Los peores resultados de IMP fueron obtenidos cuando las muestras fueron congeladas con el 5% glicerol (T2). Con respecto a la IMA, a pesar de que la criopreservación afectó mínimamente a todos los tratamientos, las muestras descongeladas del tratamiento T3 fueron superiores ($P < 0,01$) a las muestras del tratamiento T1 (Figura 13).

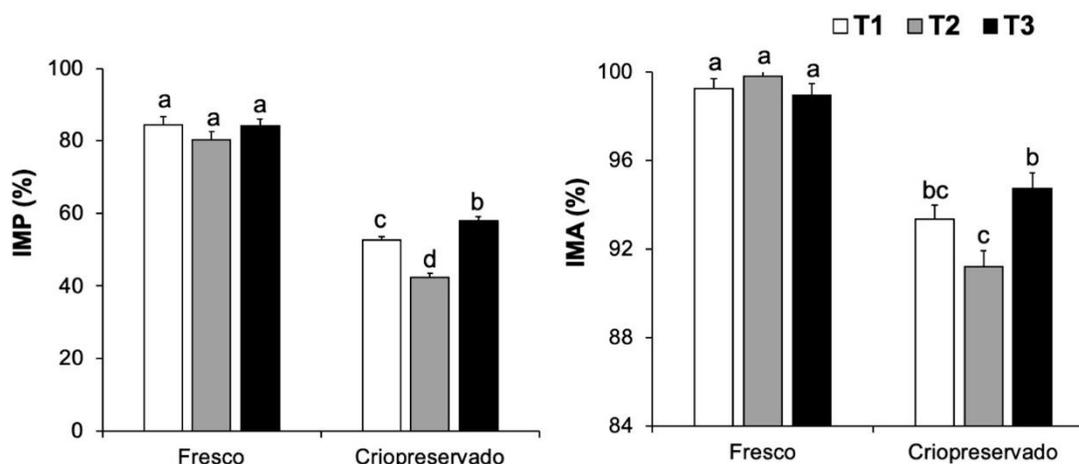


Figura 13: Integridad de la membrana plasmática (IMP, %) y acrosomal (IMA, %) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,001$; b-c, $P < 0,01$).

Estudios anteriores reportaron una viabilidad del 39%, 43%, 37% y 40% de los espermatozoides equinos después de congelarlos con GLY, ETG, DMSO y DMF, respectivamente (Alvarenga et al., 2000). Otro estudio realizado por (Gibb et al. 2013) indicaron que las características espermáticas y viabilidad post-descongelación de espermatozoides equinos seleccionados por sexo mejoraron mediante el uso de DMF como crioprotector. (Bianchi et al. 2008) obtuvieron una motilidad y viabilidad mejorada cuando GLY fue sustituido por DMF. El efecto crioprotector de la DMF se atribuyó a la mejor capacidad de la molécula más pequeña para penetrar la membrana plasmática, lo que induce menos estrés osmótico que GLY (Squires et al., 2004). Otro estudio realizado por (Ghallab et al., 2017) demostraron que la centrifugación a 600 x g durante 15 min de espermatozoides equino y entonces diluidos con INRA-82 suplementado con 5% de DMF, aumentó la motilidad, la viabilidad, la integridad de la membrana y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en comparación con el 5% de GLY.

Las amidas, incluida la DMF, se han identificado previamente como crioprotectores efectivos y como una alternativa a GLY, particularmente con respecto a mejorar la calidad in vitro y la fertilidad del esperma equino que se clasifican como "malos congeladores"

debido a la mayor susceptibilidad de su espermatozoides a la criolesión o efectos deletéreos (Alvarenga et al., 2003, 2005; Gomes et al., 2002; Madeiros et al., 2002)

6.3. Estrés osmótico

El análisis del estrés osmótico demostró que las muestras criopreservadas con los tres ACP incrementaron su porcentaje de afectación debido a los efectos deletéreos propios de la congelación. Sin embargo, después de la criopreservación, no hubo diferencias entre tratamientos (T1= 18,6±1,39; T2= 22,2±1,45; y T3= 22,2±1,39 %) (Figura 14).

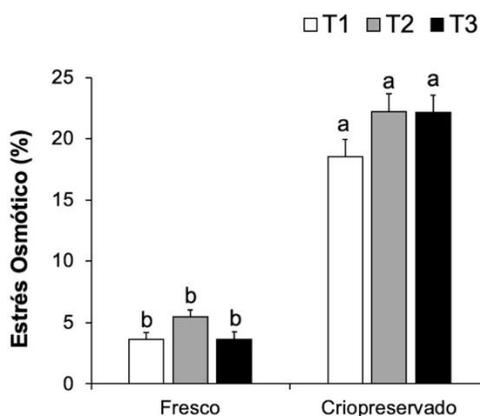


Figura 14: Estrés oxidativo(%) en muestras de semen equino frescas y criopreservadas de con diferentes crioprotectores: Tratamientos T1 (5% de DMF), T2 (5% de Glicerol) y T3 (3% DMF + 3% glicerol). Letras diferentes en cada barra y cada velocidad expresan diferencias significativas (a-b, P<0,001).

Ante los resultados obtenidos en la evaluación del estrés osmótico, se puede observar que existe una diferencia no muy significativa, debido que las muestras criopreservadas con los tres ACP incrementaron su porcentaje de afectación por los efectos deletéreos propios de la congelación, mientras que el estudio de (Guillén et al. 2009) indicaron que la integridad funcional de estas membranas fue evaluada mediante los test osmóticos (HOST y ORT), dando resultados en el proceso de congelación-descongelación un marcado efecto nocivo sobre la integridad estructural y funcional de la MP y MA de los espermatozoides evaluados (P<0,05). Sin embargo, el estudio mostró también como los espermatozoides resisten de manera diferente los efectos

UCUENCA

detrimentales de la criopreservación. Así también, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que afectaría la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a Inseminación Artificial.

Por su parte el estudio de (Gonzalez, 2018), muestra que el comportamiento de las membranas espermáticas en la zona valle de Mexicali y zona costa del estado de Baja California, se comportan iguales al resto de los lugares en los cuales se ha realizado estudios similares, observando ($r=0.551$), en donde se encontró $18,52\pm 9,11$ para el grupo A y $17,64\pm 8.054$ para el grupo B respectivamente, resultados similares a los observados en la investigación realizada, debido que no hubo diferencias entre tratamientos (T1= $18,6\pm 1,39$; T2= $22,2\pm 1,45$; y T3= $22,2\pm 1,39$ %), es decir los resultados con el test osmótico no reporta diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos, debido que no hay diferencia en el comportamiento de las membranas espermáticas, coincidiendo con los diferentes autores que ya han realizado esta prueba en otras partes del mundo.

7. CONCLUSIONES

La combinación de dimetilformamida y glicerol en bajas concentraciones (3% y 3%, respectivamente) y la suplementación al diluyente de base no sintética Botusemem-Gold proporcionó una mejor crio-protección a los espermatozoides de caballo Árabe basado en una mayor cinemática e integridad de membranas con respecto a su contraparte glicerol.

8. RECOMENDACIONES

- No existe un diluyente que sea ideal para ser utilizado en todos los sementales, ni que brinde la misma efectividad final por lo que lo ideal sería optimizar los diluyentes ya existentes, la velocidad de enfriamiento y descongelación para cada caballo.
- Se recomienda continuar con más estudios en el campo, ya que este sería un primer paso para la creación de un banco de germoplasma de estos animales en el país.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarenga, M. A., Ozanam, P. F., & Rámires, N. C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *National Center for Biotechnology Information*, 59. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27726989/>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Alvarenga, M. A., Leão, K. M., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L., & Gomes, G. M. (2003). The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph*, 12, 74–76.
- Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, 69(1), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008>
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. In *Journal of Equine Veterinary Science* (Vol. 7, Issue 3, pp. 145–173). [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Anwer, A., Rawash, Z., & El-badry, D. A. M. (2014). Effect of Different Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate, Egg Yolk and Glycerol on the Freezability and Dna Integrity of Arabian Stallion Spermatozoa. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 60(141), 29–37. <https://doi.org/10.21608/avmj.2014.170747>
- Ball, B. A., Vo, A. T., & Baumber, J. (2000). *Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa*.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the

- mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Betancur, G. R., López, E. P., & Rojano, B. A. (2013). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 128–136.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18, 4–6.
- Brinsko, S., Blanchard, T., Varner, D., Schumacher, J., & Love, C. (2011). *MANUAL OF EQUINE REPRODUCTION* (M. Elsevier (ed.); tercera).
- Burns, P. J., & Reasner, D. S. (1995). Computerized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 15(9), 377–380. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(07\)80480-1](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(07)80480-1)
- Castro, M. K., & González, C. S. (2018). Modern Methods Of Seminal Evaluation In Equine. *Universidad Cooperativa de Colombia*, 29. Obtenido de https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf
- Celis, Á. D., Henao, A. A., Restrepo Betancur, G., Usuga Suarez, A., & Montoya Páez, J. D. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación*, 11(2), 63–70. <https://doi.org/10.22507/rli.v11n2a7>
- Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2008). A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 108(3-4), 298-308.
- Cochran, J. D., Amann, R. P., Froman, D. P., & Pickett, B. W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22(1), 25–38. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90470-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90470-9)
- Consuelo, D., & Dalmau, S. (2012). Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. *Métodos Tradicionales y Alternativos de Extracción de Semen*, 6(2), 125–134. <https://doi.org/10.5209/RCCV.40091>

- Contreras, W., & Santiani, A. (2020). *Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (Vicugna pacos)*. 31(1), 1–9.
- Cook, N. L., Masterson, K. R., Battaglia, D., Beck, R., & Metcalf, E. S. (2019). Dimethyl sulfoxide and glycerol as cryoprotectant agents of stallion semen: Effects on blastocyst rates following intracytoplasmic sperm injection of IVM equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(3), 253–258. <https://doi.org/10.1071/RD19266>
- Córdova, A., Gustavo, C., Lang, R., Córdova, C. A., Silvia, M., Jiménez, C., Eulogio, L., Estela, B., Denis, R., & Salinas, A. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Computense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1–38. <http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>
- De Leeuw, F., De Leeuw, A., Den Daas, J., Colenbrander, B., & Verkleij, A. (2016). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *National Center for biotechnology information*, 56. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8440128/>
- Díaz, N. (2010). Características Del Eyaculado Equino Y Variaciones Estacionales. Revisión Bibliográfica. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 4(1), 23–30. [http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista CIMAGT/Rev.Vol.4 No.1 2010/Vol.4\(1\)10Namibia.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista_CIMAGT/Rev.Vol.4_No.1_2010/Vol.4(1)10Namibia.pdf)
- Duran Ramirez, F. (n.d.). *INSEMINACION Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ANIMALES DE GRANJA* (grupo latino editores S.A.S (ed.); primera ed, p. 388,389).
- Elgueta, V. C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. Tesis de grado, Universidad de las Américas, Chile. Obtenido de <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Fahy, G. M., Lilley, J. T. H., Linsdell, H., St, M., Douglas, J., & Meryman, H. T. (1990). *Gregory m. fahy, *j terence h. lilley,? helen linsdell,? mary st. john douglas,*.* 268, 247–268.
- Fernandez, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., Zamora, S., Roldan, M., Rabelo, B., Ramirez, J., Yoldi, A., & Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir*, 14(1), 19–27. <https://revista.asebir.com/assets/asebir-junio-2009.pdf>
- Fernández-Santos, M. R., Estesó, M. C., Montoro, V., Soler, A. J., & Garde, J. J. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of concentration and temperature of addition. *Journal of Andrology*, 27(6), 734–745. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000505>
- Francisco, A. R. L. (2013). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2009/mr094b.pdf>
- Fumuso, F., & Giuliano, S. M. (2016). *Efecto del plasma seminal en la conservación de semen en especies de uso zootécnico. December.* <https://doi.org/10.18548/aspe/0004.01>
- Galarza, López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Moreno. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Elsevier*, 192, 261–270.
- 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.
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., Mcgann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- Ghallab, A. R. M., Shahat, A. M., Fadl, A. M., Ayoub, M. M., & Moawad, A. R. (2017).

- Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 79, 14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.001>
- Gibb, Z., Morris, L. H. A., Maxwell, W. M. C., & Grupen, C. G. (2013). Theriogenology Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, 79(7), 1027–1033.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.013>
- Gobato, M. L. M. (2020). *Efeito de diferentes diluentes na qualidade e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento Pêga (Equus asinus)*.
- Gomes, G. M., Jacob, J. C. F., Medeiros, A. S. L., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 58(2–4), 277–279. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00899-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00899-3)
- Gonzalez, G. G. (2018). *Evaluación de espermatozoides de equino mediante una prueba de resistencia osmótica*.
<https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2718/1/VET008222.pdf>
- Graham, J. K. (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 12(1), 131-147.
- Graham, J. K., Kunze, E., & Hammerstedt, R. H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43(1), 55–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>
- 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*, 54(4), 655–665.
<https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Guillén, Rubio Jorge L. ; Quintero, Moreno Armando A.; Villalobos, G. D. M. (2009). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros*.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010

- Gutiérrez, C. L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal*. Tesis doctoral , Universidad Complutense de Madrid , Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24898/1/T35236.pdf>
- Hafez, E. S. ., & Hafez, B. (2000). *Libro Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales* (M. hill Interamericana (ed.); septima).
- Hammerstedt, R H; Nolan, G. (1990). *Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2179184/>
- Hernández-corredor, L., & Quintero-moreno, A. (2015). *Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo en semen caprino criopreservado con dos diluyentes*. May.
- Iglesias-reyes, A. E. (2017). *Importancia del estrés oxidativo en los espermatozoides*. October.
- Lago-Alvarez, Y., Podico, G., Segabinazzi, L. G., Cunha, L. L., Barbosa, L., Arnold, C. E., Lima, F. S., King, L. T., McLean, A. K., & Canisso, I. F. (2020). Donkey epididymal transport for semen cooling and freezing. *Animals*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ani10122209>
- Loomis, P. R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 22, Issue 3, pp. 663–676). <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.002>
- Love, C. C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 32, Issue 3, pp. 531–546). <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- Madeiros, A. S., Gomes, G. M., Carmo, M., & Papa, F. . (2002). *No Title*. https://www.researchgate.net/publication/285714636_Cryopreservation_of_stallion_sperm_using_different_amides
- Maxwell, W. M. C., 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. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), 0–4.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Medeiros, A. S. L. (2003). *Cryopreservation of stallion sperm utilizing different amides*. University of Sao Paulo State(UNESP).
- Membrillo Ortega, A., Córdova Izquierdo, A., & Hicks Gómez, J. J. (2003). *PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ANTIOXIDANTES EN LA PRESERVACIÓN DE SEMEN. UNA REVISIÓN*. 28(12), 1–16.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Meryman, H. T. (2017). *Cryopreservation of living cells: principles and practice*. 29.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17465961/>
- Mesa, A., & Henao, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Scielo*, 17(1). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682012000100014
- Moffet, P. D., Bruemmer, J. E., Card, C., & Squires, E. L. (2003). Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference*, 42.
- Montoya, A. (2009). Esperpermograma. *Tecnología*, 153.
- Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., & Graham, J. K. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215–218.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.03.003>
- Morillo, R. A. (2013). Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. *Dialnet*, 29. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=38177>
- Moreno, J., & Galarza, D. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies

- domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos (Sperm cryopreservation in domestic and wild species: a review of recent advances). *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(4), 18–38.
- Morillo Rodriguez, A., Balao da Silva, C., Macías-García, B., Gallardo Bolaños, J. M., Tapia, J. A., Aparicio, I. M., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2012). Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics of Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 47, Issue 6, pp. 995–1002). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02005.x>
- Morris, G. J. (2006). Rapidly cooled human sperm: No evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21(8), 2075–2083. <https://doi.org/10.1093/humrep/del116>
- Neto, C. R., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell’acqua, J. A., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2013). Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(1), 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.008>
- Oldenhof, H., Bigalk, J., Hettel, C., de Oliveira Barros, L., Sydykov, B., Bajcsy, A. C., ... & Wolkers, W. F. (2017). Stallion sperm cryopreservation using various permeating agents: interplay between concentration and cooling rate. *Biopreservation and biobanking*, 15(5), 422-431.
- Olivo , M. D. (2019). *Elaboración de un Proyecto en Metodología Marco Lógico de Producción del Ganado Caballar de la Unidad de Equitación y Remonta de la Policía Nacional del Ecuador*. Tesis de grado , Universidad Central del Ecuador , Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20276/1/T-UCE-0014-MVE-080.pdf>
- Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., Gallardo-Bolaños, J. M., Muriel, A., González-Fernández, L., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2008). Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. *Journal of Andrology*, 29(2), 213–221. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003640>
- Palma, G., & Brem , G. (2016). Biotecnología dela reproducción. *Scielo*, 25. Obtenido de http://www.reprobiotec.com/libro_azul/cap_01.pdf

- Parra, C. (1997). *Analisis Mediante Citometria De Flujo De La Respuesta De Los Espermatozoides De Verraco a Diferentes Medios De Incubacion*. 116.
- Peña, F. J., García, B. M., Samper, J. C., Aparicio, I. M., & Tapia, J. A. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa : The way to improve current cryopreservation protocols ? *THE*, 76(7), 1177–1186.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>
- Perez-Osorio, J., Mello, F. G., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L., & Henry, M. (2008). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction*, 5(3–4), 103–109.
- Pickett, B. W., Collim, F., & Procedure, E. (1970). Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behaviour. *Colorado State University*.
- Puga-Torres, T., Blum-Rojas, X., Blum-Narváez, M., Sorroza-Rojas, N., & Cajas-Flores, N. (2018). Relation between basal sperm morphology and sperm recovered by swim up. *Revista Científica Mundo de La Investigación y El Conocimiento*, 2 num 3, 111–123.
[https://doi.org/10.26820/recimundo/2.\(3\).julio.2018.111-123](https://doi.org/10.26820/recimundo/2.(3).julio.2018.111-123)
- Restrepo , B. G., Usuga , S. A., Montoya , P. J., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Scielo*, 11(2), 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492014000200008
- Restrepo Betancur, Giovanni; Úsuga Suárez, Alexandra; Rojano, B. A. (2013). *Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen* π *Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino*.
- Rica, C. (2012). Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino. *Revista Ciencias Veterinarias*, 26(1), 7–20.
- Robinson, N. E. (2012). *current terapy in equine medicine*.
- Santiani, A., Evangelista-Vargas, S., Vargas, S., Gallo, S., Ruiz, L., Orozco, V., & Rosemberg, M. (2017). Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa:

dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia*, 49(6), 10–12.

<https://doi.org/10.1111/and.12672>

Sieme, H., Harrison, R. A. P., & Petrunkina, A. M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 276–292. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.001>

Squires, E. L., Keith, S. L., & Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.024>

Sztejn, J. M., Noble, K., Farley, J. S., & Mobraaten, L. E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42(1), 28–39. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2300>

Thompson, D. L., Pickett, B. W., Berndtson, W. E., Voss, J. L., & Mett, T. M. (1977). Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum. *Journal of Animal Science*, 44(4), 656–664. <https://doi.org/10.2527/jas1977.444656x>

Thuwanut, P., Chatdarong, K., Johannisson, A., Bergqvist, A. S., Söderquist, L., & Axné, E. (2010). Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology*, 73(8), 1076–1087. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.007>

Vafaei, F., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Ahmad, E., & Seifi-Jamadi, A. (2019). Influence of Different Combinations of Permeable and Nonpermeable Cryoprotectants on the Freezing Capacity of Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.014>

Varner, D. D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70(3), 448–462. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.023>

Vidament, M., Daire, C., Yvon, J. M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., & Ecot, P. (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl

formamide. *Theriogenology*, 58(2–4), 249–251. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00854-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00854-3)

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481-492.

Watson, P. F., & Holt, W. V. (2001). Cryobanking the Genetic Resource; Wildlife Conservation for the Future? *Cryobiology*, 46.1, 103–105.

Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dong, H., Zhang, G., Yu, W., Tian, F., He, L., & Chen, J. (2015). Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 163, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.020>

Yotov, S. (2015). Effect of TFC-based extenders with soybean lecithin and / or low concentration of glycerol on the quality of goat chilled-stored semen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 752–761.

Zurita , B. R. (2019). *Evaluación de glicerol, etilenglicol, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de Alpaca*. Tesis de grado , Universidad Científica del Sur , Lima. Obtenido de <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1335/TL-Zurita%20R.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

Anexo 1

Valores promedios \pm SEM (erros estándar de la media) de los parámetros cinéticos y de integridad de membranas plasmática- acrosomal en muestras frescas y criopreservadas con tres tratamientos

Parámetros cinéticos	Fresco			Criopreservado		
	T1 (n=18)	T2 (n=18)	T3 (n=18)	T1 (n=90)	T2 (n=81)	T3 (n=84)
MT (%)	89,3 \pm 1,81	83,9 \pm 3,52	88,7 \pm 2,10	53,2 \pm 1,80	41,4 \pm 2,35	54,2 \pm 2,25
MP (%)	65,8 \pm 3,48	63,7 \pm 4,42	69,2 \pm 3,29	25,1 \pm 1,42	16,1 \pm 1,50	28,4 \pm 1,76
VCL (μ m/s)	105 \pm 4,23	102 \pm 5,43	111 \pm 4,49	54,0 \pm 1,58	42 \pm 1,60	58 \pm 1,71
VAP (μ m/s)	60,5 \pm 2,81	72,9 \pm 3,99	70,5 \pm 2,79	31,1 \pm 0,92	28,8 \pm 1,12	37,3 \pm 1,13
VSL (μ m/s)	39,9 \pm 2,18	45,1 \pm 2,07	42,5 \pm 1,96	24,5 \pm 0,73	24,0 \pm 1,00	29,9 \pm 0,90
STR (%)	64,3 \pm 1,87	61,1 \pm 1,76	59,7 \pm 2,24	71,6 \pm 0,74	71,1 \pm 0,98	72,8 \pm 0,78
LIN (%)	38,2 \pm 1,44	43,4 \pm 1,62	38,3 \pm 1,96	43,1 \pm 0,88	49,0 \pm 1,20	48,2 \pm 0,99
WOB (%)	57,1 \pm 1,28	68,3 \pm 1,52	61,7 \pm 1,25	56,3 \pm 0,77	62,6 \pm 1,02	61,7 \pm 0,87
ALH (μ m)	3,9 \pm 0,16	3,5 \pm 0,19	4,0 \pm 0,15	2,3 \pm 0,06	1,7 \pm 0,05	2,25 \pm 0,05
BCF (Hz)	10,7 \pm 0,42	9,0 \pm 0,47	10,7 \pm 0,45	8,5 \pm 0,20	6,4 \pm 0,22	8,4 \pm 0,22
Parámetros de Fluorescencia						
IPIA (%)	83,8 \pm 2,19	80,0 \pm 2,36	83,6 \pm 1,94	49,6 \pm 0,94	38,6 \pm 0,98	55,0 \pm 1,07
IPDA (%)	0,5 \pm 0,19	0,3 \pm 0,32	0,4 \pm 0,25	3,0 \pm 0,31	3,9 \pm 0,33	3,0 \pm 0,28
DPIA (%)	15,4 \pm 2,33	19,9 \pm 1,99	15,4 \pm 1,53	43,7 \pm 1,24	52,7 \pm 1,34	39,8 \pm 1,26
DPDA (%)	1,0 \pm 0,38	0,9 \pm 0,14	1,1 \pm 0,6	3,7 \pm 0,48	5,0 \pm 0,43	3,2 \pm 0,23
IMP (%)	84,4 \pm 2,21	80,3 \pm 2,34	84,1 \pm 1,82	52,6 \pm 0,99	42,5 \pm 1,07	58,0 \pm 1,11
IMA (%)	99,3 \pm 0,83	99,8 \pm 1,5	99,0 \pm 1,03	93,3 \pm 0,65	91,2 \pm 0,72	94,7 \pm 0,71
Estrés Osmótico (%)	3,6 \pm 0,56	5,5 \pm 0,54	3,7 \pm 0,60	18,6 \pm 1,39	22,2 \pm 1,45	22,2 \pm 1,39

MT: motilidad total; MP: motilidad progresiva; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad de trayectoria media; VSL: velocidad en línea recta; STR: rectitud; LIN: linealidad; WOB: oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batida del flagelo; IPIA: membrana plasmática intacta/acrosoma intacto; IPDA: membrana plasmática intacta/acrosoma dañado; DPIA: membrana plasmática dañada/acrosoma intacto; DPDA: membrana plasmática dañada/acrosoma dañado; IMP: membrana plasmática intacta o (viabilidad); y IMA: membrana acrosomal intacta.

UCUENCA

Anexo 2

Valores promedios \pm SEM de los parámetros cinéticos en muestras frescas y criopreservadas con tres tratamientos (T1 – T3) por reproductor

SEMEN	TTTO.	REPROD.	MT	MP	VCL	VAP	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF	n
FRESCO	T1	HIJO	96,1 \pm 0,97	78,3 \pm 3,50	113,6 \pm 5,5	59,1 \pm 3,89	39,0 \pm 1,24	66,4 \pm 2,03	36,3 \pm 1,69	53,2 \pm 2,55	4,6 \pm 0,21	11,0 \pm 0,73	6
		NEGRO	86,8 \pm 2,62	59,5 \pm 2,93	102,5 \pm 7,3	61,0 \pm 5,13	33,3 \pm 1,86	55,8 \pm 1,72	33,8 \pm 0,70	58,2 \pm 1,31	3,6 \pm 0,18	10,5 \pm 0,47	6
		PADRE	85,1 \pm 3,44	59,6 \pm 7,43	97,4 \pm 8,5	61,5 \pm 6,21	47,5 \pm 4,78	70,7 \pm 2,22	44,4 \pm 2,31	59,8 \pm 1,94	3,4 \pm 0,21	10,7 \pm 1,00	6
		TOTAL	89,3 \pm 1,81	65,8 \pm 3,48	105 \pm 4,23	60,5 \pm 2,81	39,9 \pm 2,18	64,3 \pm 1,87	38,2 \pm 1,44	57,1 \pm 1,28	3,9 \pm 0,16	10,7 \pm 0,42	18
	T2	HIJO	94,5 \pm 1,43	76,5 \pm 6,08	115,5 \pm 9,1	78,0 \pm 7,32	47,7 \pm 3,96	60,2 \pm 3,40	40,9 \pm 3,36	65,5 \pm 2,70	4,1 \pm 0,23	10,5 \pm 0,79	6
		NEGRO	83,0 \pm 2,77	60,9 \pm 4,66	98,6 \pm 7,2	75,2 \pm 6,30	43,2 \pm 3,60	57,9 \pm 3,15	43,9 \pm 3,29	72,6 \pm 2,63	3,1 \pm 0,26	8,0 \pm 0,46	6
		PADRE	74,3 \pm 8,69	53,7 \pm 9,29	92,5 \pm 10,5	65,4 \pm 7,18	44,5 \pm 3,60	65,3 \pm 2,05	45,5 \pm 1,58	66,6 \pm 1,94	3,4 \pm 0,35	8,4 \pm 0,84	6
		TOTAL	83,9 \pm 3,52	63,7 \pm 4,42	102 \pm 5,43	72,9 \pm 3,99	45,1 \pm 2,07	61,1 \pm 1,76	43,4 \pm 1,62	68,3 \pm 1,52	3,5 \pm 0,19	9,0 \pm 0,47	18
	T3	HIJO	97,0 \pm 0,99	82,4 \pm 1,14	122,0 \pm 2,3	70,3 \pm 3,11	44,1 \pm 2,01	61,4 \pm 2,74	35,9 \pm 1,84	57,0 \pm 1,72	4,4 \pm 0,12	12,1 \pm 0,57	6
		NEGRO	85,1 \pm 2,53	61,8 \pm 2,69	111,1 \pm 6,8	72,0 \pm 5,11	35,4 \pm 1,58	51,4 \pm 3,58	32,9 \pm 2,50	62,2 \pm 1,12	3,9 \pm 0,22	10,1 \pm 0,62	6
		PADRE	83,9 \pm 4,07	63,2 \pm 6,99	101,2 \pm 10,5	69,4 \pm 6,52	48,1 \pm 3,95	66,2 \pm 2,81	46,0 \pm 3,28	65,9 \pm 1,92	3,6 \pm 0,30	10,0 \pm 0,87	6
		TOTAL	88,7 \pm 2,10	69,2 \pm 3,29	111 \pm 4,49	70,5 \pm 2,8	42,5 \pm 1,96	59,7 \pm 2,24	38,3 \pm 1,96	61,7 \pm 1,25	4,0 \pm 0,15	10,7 \pm 0,45	18
CRIOPRESERVADO	T1	HIJO	64,5 \pm 2,82	33,2 \pm 2,13	58,2 \pm 2,2	33,3 \pm 1,08	27,0 \pm 1,01	74,9 \pm 1,02	45,3 \pm 1,51	57,7 \pm 1,42	2,4 \pm 0,09	9,2 \pm 0,32	29
		NEGRO	52,2 \pm 2,78	27,2 \pm 2,21	62,0 \pm 3,0	34,7 \pm 1,94	25,8 \pm 1,40	68,2 \pm 1,29	39,4 \pm 1,20	54,0 \pm 1,20	2,5 \pm 0,09	8,9 \pm 0,41	27
		PADRE	44,3 \pm 2,64	16,5 \pm 2,01	44,8 \pm 2,1	26,4 \pm 1,30	21,4 \pm 1,14	71,3 \pm 1,26	44,0 \pm 1,57	57,1 \pm 1,32	1,9 \pm 0,09	7,6 \pm 0,26	34
		TOTAL	53,2 \pm 1,80	25,1 \pm 1,42	54 \pm 1,58	31,1 \pm 0,92	24,5 \pm 0,73	71,6 \pm 0,74	43,1 \pm 0,88	56,3 \pm 0,77	2,3 \pm 0,06	8,5 \pm 0,20	90
	T2	HIJO	53,8 \pm 3,31	24,0 \pm 2,39	48,2 \pm 2,1	34,1 \pm 1,45	29,6 \pm 1,34	76,7 \pm 0,94	54,5 \pm 1,34	66,5 \pm 1,17	1,9 \pm 0,08	7,6 \pm 0,29	29
		NEGRO	40,2 \pm 3,85	16,5 \pm 2,46	45,0 \pm 3,1	31,2 \pm 1,90	25,3 \pm 1,56	70,0 \pm 1,38	49,5 \pm 2,03	63,9 \pm 1,65	1,7 \pm 0,11	6,3 \pm 0,33	25
		PADRE	29,3 \pm 3,69	7,4 \pm 1,75	32,1 \pm 2,1	20,7 \pm 1,47	16,8 \pm 1,28	66,1 \pm 1,98	42,5 \pm 2,20	57,3 \pm 1,96	1,5 \pm 0,07	5,2 \pm 0,36	27
		TOTAL	41,4 \pm 2,35	16,1 \pm 1,50	42 \pm 1,60	28,8 \pm 1,12	24,0 \pm 1,00	71,1 \pm 0,98	49,0 \pm 1,20	62,6 \pm 1,02	1,7 \pm 0,05	6,4 \pm 0,22	81
	T3	HIJO	68,0 \pm 3,58	38,5 \pm 2,90	63,8 \pm 3,1	40,3 \pm 1,85	33,6 \pm 1,50	76,1 \pm 1,21	49,6 \pm 1,69	61,6 \pm 1,56	2,4 \pm 0,10	9,7 \pm 0,37	26
		NEGRO	51,1 \pm 3,33	28,4 \pm 2,57	62,9 \pm 2,4	40,0 \pm 1,82	29,9 \pm 1,29	69,1 \pm 0,92	45,0 \pm 1,15	60,5 \pm 1,15	2,4 \pm 0,07	8,5 \pm 0,34	30
		PADRE	44,8 \pm 3,56	18,9 \pm 2,63	47,1 \pm 2,4	31,6 \pm 1,80	26,6 \pm 1,64	73,9 \pm 1,54	50,3 \pm 2,10	62,9 \pm 1,79	1,9 \pm 0,08	7,2 \pm 0,28	28
		TOTAL	54,2 \pm 2,25	28,4 \pm 1,76	58 \pm 1,71	37,3 \pm 1,13	29,9 \pm 0,90	72,8 \pm 0,78	48,2 \pm 0,99	61,7 \pm 0,87	2,3 \pm 0,05	8,4 \pm 0,22	84

Anexo 3

Valores promedios \pm SEM de los parámetros de fluorescencia en muestras frescas y criopreservadas con tres tratamientos (T1 – T3) por reproductor

SEMEN	TTTO.	REPROD.	IPIA	IPDA	DPIA	DPDA	IMP	IMA	n
FRESCO	T1	NEGRO	84,0 \pm 3,80	0,67 \pm 0,33	14,0 \pm 3,47	1,33 \pm 0,99	84,7 \pm 4,76	98,0 \pm 1,29	6
		PADRE	78,4 \pm 4,68	0,62 \pm 0,45	21,5 \pm 5,13	0,33 \pm 0,33	79,0 \pm 4,90	99,9 \pm 1,11	6
		HIJO	89,1 \pm 0,88	0,33 \pm 0,21	10,8 \pm 2,18	1,20 \pm 0,49	89,5 \pm 0,82	100,0 \pm 1,89	6
		TOTAL	83,8 \pm 2,19	0,5 \pm 0,19	15,4 \pm 2,33	1,0 \pm 0,38	84,4 \pm 2,21	99,3 \pm 0,83	18
	T2	NEGRO	75,2 \pm 4,45	0,95 \pm 0,95	23,2 \pm 4,44	0	76,2 \pm 4,52	98,4 \pm 1,05	6
		PADRE	78,8 \pm 4,18	0	19,5 \pm 3,69	1,53 \pm 0,96	78,8 \pm 4,18	98,3 \pm 0,96	6
		HIJO	85,9 \pm 2,81	0	17,0 \pm 1,83	1,13 \pm 0,70	85,9 \pm 2,81	100,0 \pm 1,28	6
		TOTAL	80,0 \pm 2,36	0,3 \pm 0,32	19,9 \pm 1,99	0,9 \pm 0,40	80,3 \pm 2,34	99,8 \pm 1,50	18
	T3	NEGRO	83,9 \pm 3,90	0,83 \pm 0,54	13,8 \pm 2,94	1,50 \pm 1,31	84,7 \pm 3,34	97,7 \pm 1,67	6
		PADRE	81,8 \pm 4,15	0,50 \pm 0,50	16,0 \pm 2,97	1,67 \pm 1,31	82,3 \pm 3,76	97,7 \pm 1,80	6
		HIJO	85,1 \pm 2,23	0	16,3 \pm 2,38	0,25 \pm 0,25	85,1 \pm 2,23	100,0 \pm 1,73	6
		TOTAL	83,6 \pm 1,94	0,4 \pm 0,25	15,4 \pm 1,53	1,1 \pm 0,60	84,1 \pm 1,82	99,0 \pm 1,03	18
DESCONGELADO	T1	NEGRO	47,0 \pm 1,96	2,05 \pm 0,55	47,6 \pm 2,50	3,35 \pm 0,89	49,0 \pm 2,11	94,5 \pm 1,12	20
		PADRE	50,3 \pm 1,46	2,91 \pm 0,50	43,9 \pm 1,99	3,09 \pm 0,80	53,3 \pm 1,53	94,2 \pm 1,13	23
		HIJO	51,3 \pm 1,42	3,91 \pm 0,49	40,2 \pm 1,78	4,61 \pm 0,79	55,2 \pm 1,34	91,5 \pm 1,07	23
		TOTAL	49,6 \pm 0,94	3,0 \pm 0,31	43,7 \pm 1,24	3,7 \pm 0,48	52,6 \pm 0,99	93,3 \pm 0,65	66
	T2	NEGRO	38,3 \pm 1,92	4,11 \pm 0,69	53,2 \pm 2,70	4,78 \pm 0,94	42,4 \pm 2,15	91,5 \pm 1,66	18
		PADRE	39,3 \pm 1,64	4,15 \pm 0,59	51,4 \pm 2,53	5,20 \pm 0,71	43,5 \pm 1,93	90,7 \pm 1,12	20
		HIJO	38,2 \pm 1,62	3,52 \pm 0,47	53,3 \pm 1,93	4,96 \pm 0,65	41,7 \pm 1,63	91,5 \pm 1,04	23
		TOTAL	38,6 \pm 0,98	3,9 \pm 0,33	52,7 \pm 1,34	5,0 \pm 0,43	42,5 \pm 1,07	91,2 \pm 0,72	61
	T3	NEGRO	52,3 \pm 1,28	2,82 \pm 0,55	42,1 \pm 1,90	3,27 \pm 0,45	55,1 \pm 1,53	94,5 \pm 1,09	22
		PADRE	54,7 \pm 1,61	3,10 \pm 0,54	41,7 \pm 2,10	3,05 \pm 0,37	57,8 \pm 1,57	96,4 \pm 1,95	20
		HIJO	57,6 \pm 2,29	3,17 \pm 0,40	36,1 \pm 2,32	3,17 \pm 0,38	60,8 \pm 2,28	93,7 \pm 0,47	24
		TOTAL	55,0 \pm 1,07	3,0 \pm 0,28	39,8 \pm 1,26	3,2 \pm 0,23	58,0 \pm 1,11	94,7 \pm 0,71	66

Anexo 4 Estrés Osmótico

SEMEN	TTTO.	REPROD-	ESTRÉS OXIDATIVO (%)	n
FRESCO	T1	NEGRO	3,0 ± 0,58	3
		HIJO	2,5 ± 0,50	2
		PADRE	5,0 ± 1,00	3
		TOTAL	3,6 ± 0,56	8
	T2	NEGRO	5,3 ± 0,33	3
		HIJO	4,3 ± 0,85	4
		PADRE	7,3 ± 0,33	3
		TOTAL	5,5 ± 0,54	10
	T3	NEGRO	4,0 ± 0,58	3
		HIJO	2,0 ± 0,58	3
		PADRE	5,0 ± 1,15	3
		TOTAL	3,7 ± 0,6	9
CRIOPRESERVADO	T1	NEGRO	30,4 ± 2,15	28
		HIJO	14,6 ± 1,61	29
		PADRE	12,3 ± 2,02	34
		TOTAL	18,6 ± 1,39	91
	T2	NEGRO	34,9 ± 2,01	25
		HIJO	19,0 ± 1,80	29
		PADRE	14,0 ± 1,87	27
		TOTAL	22,2 ± 1,45	81
	T3	NEGRO	31,8 ± 1,96	29
		HIJO	17,8 ± 2,09	26
		PADRE	16,2 ± 2,02	28
		TOTAL	22,2 ± 1,39	83

UCUENCA

				
<p>Anexo 5: temperado de VA con agua</p>	<p>Anexo 6: verificación de temperatura en la VA</p>	<p>Anexo 7: desarmado de la VA retiro de liner usado</p>	<p>Anexo 8 : retiro de capuchón protector de luz</p>	<p>Anexo 9 : transporte muestras seminales</p>

	
<p>Anexo 10: semen colectado</p>	<p>Anexo 11: vaciado de VA</p>

UCUENCA



Anexo 12: preparación yegua



Anexo 13: monta de caballo árabe



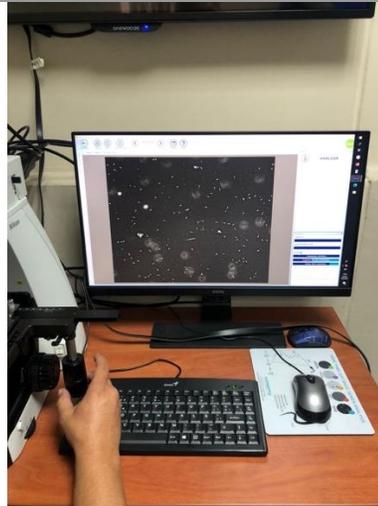
Anexo 14: recolección seminal caballo árabe



Anexo 15: vagina artificial tipo Hannover



Anexo 16: conteo concentración espermática en cámara de Neubauer



Anexo 17: valoración cinética espermática en sistema CASA®



Anexo 18: adición de agentes crioprotectores

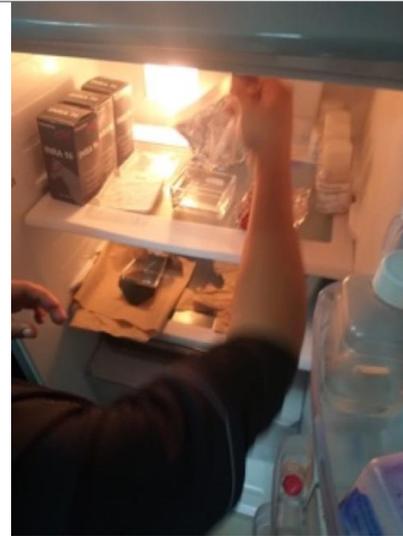


Anexo 19: fluorescencia en microscopio de contraste de fase pre congelación

UCUENCA



Anexo 20: esterilización en cámara de luz ultravioleta de pajuelas



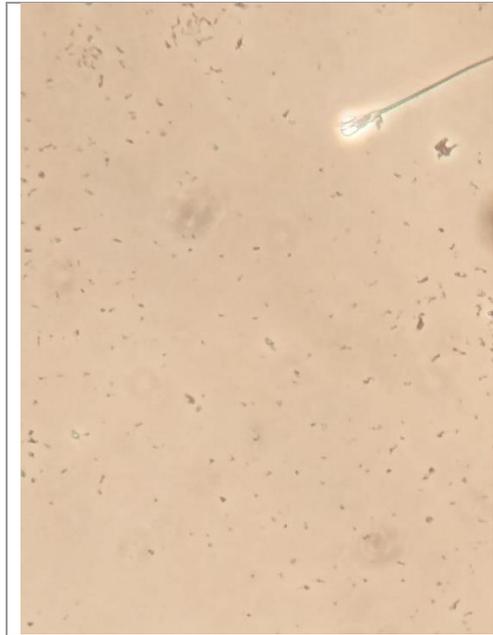
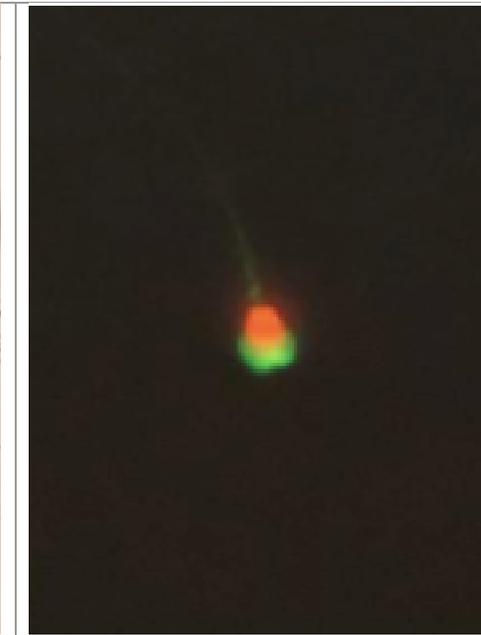
Anexo 21: estabilización y empajuelado



Anexo 22: congelado vapores de nitrógeno



Anexo 23: sumergido pajuelas en nitrógeno líquido

	
<p>Anexo 24: valoración test osmótico con glutaraldehído 2%</p>	<p>Anexo 25: prueba de fluorescencia, integridad membrana plasmática y acrosoma</p>