



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de  
criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española  
de entre 6 y 10 años- Ecuador**

**Leonela Viviana Clavijo Barrera**

**Dr.Francisco Caiza de la Cueva, Ph.D., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Quito, mayo de 2015

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de  
criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española  
de entre 6 y 10 años- Ecuador**

**Leonela Viviana Clavijo Barrera**

Francisco Caiza de la Cueva, Ph.D.,

\_\_\_\_\_

Director de Tesis

Mario Caviedes, Ph.D.,

\_\_\_\_\_

Miembro de Comité de Tesis

Andrés Torres, Ph.D.,

\_\_\_\_\_

Miembro de Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.,

\_\_\_\_\_

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política. Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----

Nombre: Leonela Viviana Clavijo Barrera  
C. I.: 1716560691  
Lugar y fecha: Quito, mayo de 2015

**DEDICATORIA**

A mi mamá Gloria, mi padre Antonio, mis hermanos Ana y Joel

A Byron Mullo

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por haberme financiado este proyecto y haberme apoyado siempre.

A mi hermana y hermano por apoyarme y aconsejarme.

Un sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Francisco Caiza de la Cueva por haber estado en todo momento durante la realización de este proyecto, brindándome su apoyo y su orientación en todo sentido.

A Dr. Diego Oñate por haberme ayudado y guiado.

A Mario Caviedes por su colaboración para poder realizar los análisis estadísticos de este estudio.

A Andrés Torres por sus observaciones y correcciones.

Agradezco a la empresa BIOGENSA® y a todo su personal, por haberme abierto sus puertas y facilitarme algunos materiales para la realización de este proyecto.

A los distintos ganaderos de la Hacienda Cortijo de Solanda, Sr. Guido Argero y Sr. Alfredo Arguero; Criadero Agropasos, Sr. Fernando Hidrobo; Criadero Santa María de Guachalá, Econ. Ivan Nieto y Criadero Rancho Alegre, Sr. Luis Gamboa, por haberme facilitado el personal de apoyo y los caballos para este estudio.

A mis amigos por ser parte de mi vida y apoyarme.

A Byron Mullo por estar siempre ahí brindándome su amor, y por su gran ayuda y paciencia durante todo el proceso.

## RESUMEN

Se colectaron eyaculados de cuatro sementales de raza Española (*Equus ferus caballus*), de entre 6 y 10 años de edad, mediante vagina artificial tipo Hanover. Se evaluaron parámetros técnicos en los eyaculados previos a la criopreservación como porcentaje de motilidad total, concentración espermática, porcentaje de células espermáticas vivas/muertas y anormalidades morfológicas. Se evaluó la eficiencia de dos diluyentes comerciales para criopreservación, BotuCrio® y EquiPRO® CryoGuard™. Las muestras seminales diluidas fueron congeladas en pajuelas (0.5mL) con nitrógeno líquido a -196°C después de haber sido tratadas con los diluyentes BotuCrio® y EquiPRO® CryoGuard™. Después de 24 horas se descongeló una pajuela de cada diluyente y eyaculado, en baño María a 37°C por 30 segundos, y se evaluó la calidad del eyaculado con los mismos parámetros técnicos antes indicados. El ANOVA, mostró que hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en las muestras seminales diluidas con BotuCrio®, las cuales mostraron una mejor calidad seminal después del congelamiento, que con el diluyente EquiPRO® CryoGuard™.

### ABSTRACT

Ejaculates were collected by artificial vagina (Hanover) from four Spanish stallions (*Equus ferus caballus*), from 6 to 10 years old; and evaluated before freezing for percentage sperm motility, concentration, percentage of viability (live-dead, eosin-nigrosin stain), and morphological abnormalities. The efficacies of two commercial extenders BotuCrio® and EquiPRO® CryoGuard™, containing egg yolk, were tested for semen cryopreservation. Diluted semen samples were frozen in straws (0.5 mL) on liquid nitrogen at -196°C after extension with BotuCrio® Semen Extender and EquiPRO® CryoGuard™. After 24 hours one straw from each extender and ejaculate was thawed in a 37°C water bath for 30 seconds after freezing, and post thaw quality was evaluated by the same technical parameters. The ANOVA test, showed that there was a significant ( $P \leq 0.05$ ) in semen samples diluted with BotuCrio® extender compared with EquiPRO® CryoGuard™-extended semen.



## Tabla de Contenidos

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 12 |
| 1.1. Antecedentes .....  | 13 |
| 1.2. Criopreservación .....  | 14 |
| 1.3. Criopreservación de semen equino .....  | 15 |
| 1.4. Espermatozoide equino .....   | 17 |
| 1.5. Extracción y manejo del eyaculado para la criopreservación .....                  | 18 |
| 1.6. Características generales del eyaculado equino previo a la criopreservación ..... | 19 |
| 1.7. Enfriamiento previo a la criopreservación del eyaculado equino .....              | 19 |
| 1.8. Evaluación post congelación .....   | 20 |
| 1.9. Diluyente para el transporte de material seminal equino .....                     | 20 |
| 1.9.1. Leche .....   | 20 |
| 1.10. Diluyentes para la criopreservación de semen equino .....                        | 21 |
| 1.10.1. BotuCrio® .....  | 22 |
| 1.10.2. EquiPRO®- CryoGuard™ + yema de huevo .....                                     | 23 |
| 2. JUSTIFICACIÓN .....   | 24 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 26 |
| 3.1. Objetivo general .....  | 26 |
| 3.2. Objetivos específicos .....   | 26 |
| 4. ÁREA DE ESTUDIO .....   | 27 |
| 5. MATERIALES .....  | 28 |
| 5.1. Sementales .....  | 28 |
| 5.2. Campo .....   | 28 |
| 5.3. Transporte .....  | 29 |
| 5.4. Evaluación microscópica en laboratorio .....                                      | 29 |
| 5.5. Congelación de muestras seminales .....   | 30 |
| 5.6. Almacenamiento de las muestras seminales .....                                    | 30 |
| 5.7. Descongelación de muestras seminales .....  | 30 |
| 5.8. Evaluación de las muestras seminales .....  | 31 |
| 6. MÉTODOS .....   | 32 |
| 6.1. Medidas de seguridad del personal .....   | 32 |
| 6.2. Preparación del espacio físico .....  | 32 |
| 6.3. Preparación, estímulo del semental .....  | 32 |
| 6.4. Preparación de la yegua .....   | 32 |
| 6.5. Armado de la vagina artificial .....  | 33 |
| 6.6. Colecta del material seminal .....  | 34 |
| 6.7. Evaluación Macroscópica del material seminal .....                                | 34 |
| 6.8. Dilución del semen fresco para transporte .....                                   | 34 |
| 6.9. Empacado de la muestra seminal .....  | 35 |
| Laboratorio .....  | 35 |
| 6.10. Evaluación de motilidad total .....  | 35 |
| 6.11. Concentración espermática .....  | 35 |
| 6.12. Determinación de vivos/muertos- Tinción eosina- nigrosina .....                  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 6.13. Evaluación de la morfología espermática .....  | 36 |
| 6.14. Previo a la Criopreservación .....   | 36 |
| 6.14.1. Preparación del diluyente EquiPRO® CryoGuard™ .....  | 36 |
| 6.14.2. Preparación del diluyente BotuCrio® .....  | 37 |
| 6.15. Dilución de las muestras en medio crioprotector.....   | 37 |
| 6.16. Criopreservación .....   | 37 |
| 6.17. Evaluación poscongelación.....   | 38 |
| 6.18. Diseño experimental .....  | 38 |
| 6.19. Análisis Estadístico.....  | 38 |
| 7. RESULTADOS .....  | 39 |
| 7.1. Características Macroscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.....   | 39 |
| 7.2. Características Microscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.....   | 39 |
| 7.3. Características Microscópicas de los eyaculados Luego de la Criopreservación con el Medio- BotuCrio®.....   | 40 |
| 7.4. Características Microscópicas de los eyaculados Luego de la Criopreservación con el Medio- EquiPRO® CryoGuard™.....                                       | 41 |
| 7.5. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas luego de la criopreservación.....  | 42 |
| 7.6. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas por edades luego de la criopreservación.....   | 42 |
| 8. DISCUSIÓN:.....   | 44 |
| 8.1. Evaluación de calidad del eyaculado .....   | 44 |
| 8.2. Evaluación de la criopreservación analizada por motilidad .....   | 44 |
| 8.3. Evaluación de la concentración previa a la criopreservación .....   | 49 |
| 8.4. Evaluación vivos/muertos antes y después de la criopreservación.....  | 49 |
| 8.5. Evaluación de alteraciones morfológicas antes y después de la criopreservación ...  | 51 |
| 8.6. Plasma seminal y centrifugación .....   | 52 |
| 9. CONCLUSIONES.....   | 54 |
| 10. RECOMENDACIONES .....  | 55 |
| 11. Referencias .....  | 56 |
| 12. Tablas .....   | 66 |
| Tabla 1. Datos de los sementales .....   | 66 |
| Tabla 2. Características Macroscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.....   | 67 |
| Tabla 3. ANOVA de una vía de las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, previas a la criopreservación ..... | 68 |
| Tabla 4. Características Microscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.....   | 69 |
| Tabla 5. Características Microscópicas de los Eyaculados Luego de la Criopreservación con BotuCrio®.....   | 70 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 6. ANOVA de una vía de las características Microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, luego de la criopreservación con BotuCrio® .....   | 71 |
| Tabla 7. Características Microscópicas de los Eyaculados Luego de la Criopreservación con EquiPRO® CryoGuard™ .....   | 72 |
| Tabla 8. ANOVA de una vía de las características Microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, luego de la criopreservación con EquiPro®CryoGuard™ .....                                      | 73 |
| Tabla 9. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas de las muestras de los cuatro sementales luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™ .....   | 73 |
| Tabla 10. ANOVA de las características microscópicas de las muestras, de los cuatro sementales separados por edades, luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™ ..... | 74 |
| Tabla 11. Comparación de la variación de los resultados de las características microscópicas previas y después de la criopreservación .....   | 75 |
| 13. ANEXOS .....  | 76 |
| Anexo 1. Valores normales para los parámetros seminales según varios autores .....  | 76 |
| Anexo 2. Ficha técnica del diluyente BotuCrio® .....  | 77 |
| Anexo 3. Ficha técnica del diluyente EquiPRO® CryoGuard™.....   | 78 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la prehistoria, el hombre se ha servido de varios animales para realizar diferentes actividades. Uno de los más importantes es el caballo (*Equus ferus caballus*), el cual ha sido de gran utilidad en guerras, trabajos y como medio de transporte. Actualmente, la importancia de los caballos reside principalmente en: deportes, entretenimiento, consumo alimenticio, trabajo y transporte. El valor genético de los caballos se ve reflejado en su raza, grado de adiestramiento, logros obtenidos y el potencial físico, por lo que su valor comercial es muy alto (Costa y otros., 2008; Argentinos, 2013).

Una de las razas de caballo más destacadas alrededor del mundo es la “Pura Raza Española” (P.R.E), la cual ha existido en la península Ibérica por más de 3000 años. Esta corresponde a una de las razas más antiguas, por delante de los caballos Lusitano y otros caballos Warmblood<sup>1</sup>. Antes del inicio del siglo XX, el caballo español ya habitó en la mayor parte del continente Europeo (Gojowsky y otros.,2013; Borque y otros., 2006).

El caballo Pura Raza Española también llamado “Caballo Andaluz”, es reconocido debido a su gran agilidad, versatilidad, nobleza y fortaleza para desplazarse en terrenos escabrosos ya que son más hábiles que los caballos de sangre fría (caballos pesados o de tiro). Además, participa en diferentes actividades dentro de las artes ecuestres ya que tiene una aptitud natural para la doma (de alta escuela, clásica, y vaquera), el rejoneo, acoso y derribo, enganche, corridas de toros, y trabajos de campo con el ganado bravo (Mandina y Rey , 2015). Por sus características anatómicas (perfil convexo o recto con frente amplia, orejas pequeñas y rectas, cuello fuerte y arqueado y un cuerpo proporcionado y robusto) ha sido considerado un animal extremadamente elegante y es el predilecto sobre otras razas (Mandina y Rey , 2015; Valladares , 2007).

---

<sup>1</sup> Warmblood: mezcla de caballo que se da tras la cruce entre un caballo árabe y un tipo pony.

En la actualidad, alrededor del mundo se han formado asociaciones de criaderos de caballos de Pura Raza Española, que velan por mantener los estándares de calidad de esta raza. Se premia a los mejores ejemplares mediante concursos morfológicos en los cuales se determina su pureza y la morfología característica de estos animales. Además, el arte ecuestre y sus aficionados exigen ejemplares que se distingan de los demás, por lo que surge la necesidad de obtener ejemplares únicos que posean las características ideales de esta raza (Valladares , 2007).

En el Ecuador existe una gran afición al deporte ecuestre y a la cría del caballo Pura Raza Española, con criaderos ubicados en Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Azuay y Guayas. Recientemente, la demanda para esta raza en el Ecuador ha aumentado ya que existe mayor número de competencias a nivel nacional e internacional. Además, el arte taurino en varios lugares del Ecuador requiere de caballos de rejoneo (Valladares , 2007).

En el mercado mundial el valor de los caballos se basa en los reconocimientos del Criadero y los ejemplares (certificación y adiestramiento). El costo puede variar entre los 30 000 y 60 000 dólares e inclusive puede llegar a valores superiores. (Valladares , 2007)

A pesar del alto valor que tienen los caballos Pura Raza Española, los estudios realizados en el campo de la reproducción de esta raza sólo se han basado en anomalías morfológicas del esperma y gestación de la yegua (Akourki y otros, 2013). Sin embargo, no se han hecho muchos estudios sobre técnicas que puedan mejorar la preservación de material seminal ( Borque, y otros, 2006).

## **1.1. Antecedentes**

Los inicios de la criopreservación seminal se dieron con Jahnel (1938), quien observó la facultad de las células espermáticas humanas para sobrevivir temperaturas bajo 0°C;

posteriormente Polge y Rowson (1952) establecieron los fundamentos para la conservación del semen bovino mediante congelación. Merkt y Krause (1966) llevaron a cabo investigaciones en las cuales procesaron semen equino en forma de pellets (gotas de semen diluido) y congelado sobre hielo seco. Un hecho que dio un nuevo impulso a la congelación de semen equino fue el estudio de Nagase y Graham (1964), en el que se describió la dilución de semen bovino en soluciones de azúcares y su congelación sobre hielo seco (-79°C) en forma de pellets (Polge, 1957).

## **1.2. 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 espermatozoide 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 y otros., 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 y otros., 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 y otros., 2001; Blanchard y otros., 1997).

### 1.3. 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 (Ocampo y otros., 2013; Barreto y otros., 2010).

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 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 y otros., 2008; Hankins y 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 y otros., 2006).

Además, existen varias ventajas cuando se trabaja con espermatozoides en laboratorio. Por ejemplo, se puede coleccionar material seminal y realizar evaluaciones microscópicas; una simple observación de la motilidad de espermatozoides *in vitro* provee una prueba bastante sensible para evaluar la actividad funcional de las células espermáticas. Asimismo, en

muestras criopreservadas se puede evaluar el daño causado por la congelación y descongelación en diversas condiciones, para así poder determinar futuras congelaciones de material seminal de un caballo y mejorar los protocolos de congelación (Polge, 1957).

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 y otros., 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 y otros., 2013; Ball y otros., 2006).

No obstante, las células que logran sobrevivir muestran algún grado de daño, lo que disminuye su esperanza de vida en el tracto femenino (González y otros., 2009; Watson., 2000). Además, factores como la amplia variabilidad en la calidad del semen y la falta de protocolos estandarizados para manejar yeguas con semen congelado-descongelado, hacen de la criopreservación una tarea ardua (Hankins & Samper, 2001).



## 1.4. 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 y Graham., 2011; Ball y otros., 2006; Amann y Graham., 1993).

En el espermatozoide y en el plasma seminal están presentes antioxidantes, que son inhibidores de las especies reactiva de oxígeno (ERO) (Aurich C. , 2008). La principal defensa atioxidante se da por acción de la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), el glutanión reducido (GR) y el glutanión peroxidasa (GPx), presentes en el espermatozoide y en el plasma seminal (Pons y otros., 2009; Varner, 2007; Ball y otros., 2005). Estos antioxidantes contribuyen en el aumento inicial de la motilidad y de la integridad de la membrana espermática (Aurich y otros.,2006).

El óxido nítrico (ON), es fundamental para la espermatogénesis, la erección del pene, la foliculogénesis, y la ovulación (Dubey y otros., 1998). En el espermatozoide, el ON regula la motilidad espermática y la capacitación<sup>2</sup>. Además, el espermatozoide es capaz de producir ON en una cantidad adecuada para mantener la motilidad espermática, capacitación y fertilización (Gonzáles y otros., 2009; Balercia y otros., 2006; Bell y otros., 1994).

---

<sup>2</sup> Capacitación: término que hace referencia a cambios que sufre un espermatozoide cuando entra en contacto con el tracto reproductivo femenino. Los cambios incluyen la reorganización de las proteínas de la membrana y reducción en los niveles de colesterol en la membrana. Estos cambios, junto con la reacción del acrosoma, son esenciales para que el espermatozoide se una y pueda entrar por la zona pelúcida del ovocito. (Bever y otros., 2001)

## 1.5. Extracción y manejo del eyaculado para la criopreservación

En esta etapa, el lugar donde se colecta el eyaculado debe ser un área espaciosa, sin obstáculos, limpia y libre de cualquier distracción para el caballo ya que algunos sementales tienen comportamientos violentos y/o imprevisibles durante la copula. La disponibilidad de espacio es muy importante para garantizar la seguridad del personal, de la yegua y del propio animal. La colecta y procesamiento del semen requiere de un buen conocimiento del comportamiento reproductivo del caballo, del comportamiento de cada animal y de la fisiología de la erección y eyaculación (Miró y otros., 2006).

En caballos, el método más conveniente para la recolección de semen es la vagina artificial (VA) (Pycock., 2012; Miró y otros., 2006; Captain, 2002). La VA es un instrumento que intenta reproducir las condiciones naturales de la vagina de la yegua (temperatura, presión y lubricación) para estimular en el macho la eyaculación cuando se introduce el pene en ésta. Consiste en un cilindro rígido o flexible con una cubierta exterior dura o firme (normalmente látex), y una cubierta suave interior, que crea una cámara dentro de la cual se introduce agua para lograr las condiciones ideales de temperatura y presión (Miró y otros., 2006).

Existen diferentes tipos de vaginas artificiales; el modelo que se va a usar depende de las preferencias de la persona encargada de la colecta y de los requerimientos del semental. Los modelos más utilizados son: Vagina artificial Missouri, Hannover, Colorado, Nishikawa (Japonés), Cambridge, HarVet y Polaca o abierta (Miró y otros., 2006; Captain, 2002).

## **1.6. 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., 2001; Pycock., 2012; Alvarenga., 2003).

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 (Affoso y otros., 2011).

## **1.7. Enfriamiento previo a la criopreservación del eyaculado equino**

Luego de realizar la colecta de la muestra seminal, esta es examinada en cuanto a color, volumen, número total de células espermáticas, motilidad y morfología, ya que el número total de espermatozoides y la morfología son indicadores importantes de la salud testicular (Samper J. , 2009; Miró y otros., 2006).

Para empezar con el proceso de enfriamiento existen varios contenedores comerciales que están específicamente diseñados para disminuir la temperatura y transportar el semen equino. Algunos de estos contenedores son el Equitainer I™ y el Equitainer II™ , los cuales proporcionan tasas variables de enfriamiento. Es decir, las velocidades de enfriamiento se vuelven cada vez más lentas a medida que la temperatura interna se reduce, dependiendo de la temperatura ambiental y el volumen de semen diluido. El

enfriamiento previo a la criopreservación del eyaculado equino permite evitar la muerte celular por choque térmico (Dickson., 2003; Ball y otros., 2001).

## **1.8. Evaluación post congelación**

La evaluación de la motilidad espermática post descongelación es la prueba más común cuando se va a utilizar semen congelado para inseminar una yegua. La morfología espermática también debe evaluarse, en especial cuando se usa, de manera repetida a un semental. Algunos defectos espermáticos pueden afectar la penetración y la adhesión al ovocito, pero su motilidad no se ve afectada; el semen congelado de algunos sementales puede tener muy buena motilidad pero una morfología pobre, lo que puede resultar en bajas tasas de preñez en las yeguas. Por otro lado es importante evaluar la concentración espermática, ya que esta puede cambiar entre varios eyaculados de un mismo caballo (Hankins y Samper., 2001; Crabo y otros.,1991; Hickman y otros., 1988). A pesar de la falta de un método estandarizado, una dosis para inseminación debe cumplir con criterios mínimos como son: por lo menos 30-35% de motilidad y un mínimo de 50% de células espermáticas morfológicamente normales (Morris & Samper, 1998).

## **1.9. Diluyente para el transporte de material seminal equino.**

### **1.9.1. Leche**

La leche es rica en lipoproteínas, y tiene la función de estabilizar los elementos proteicos de la membrana de la célula espermática (Santos., 2014; Celeghini y otros., 2013). Sin embargo, los tipos de leche que tienen un mayor porcentaje de grasa, tienden a disminuir considerablemente la motilidad espermática, debido a que la mayor cantidad de grasa provoca una mayor aglutinación de los espermatozoides. La leche UHT independientemente de la presentación posee menor cantidad de grasa; además, permanece en condiciones aceptables durante varios meses, sin necesidad de refrigeración, tiene un

bajo costo y es de fácil manejo, por lo que puede ser utilizada como diluyente de semen para durante las primeras 24h (Santos., 2014; Arnaud y otros., 2001; Oliveira y otros., 2013; Santos, 2014)

### **1.10. Diluyentes para la criopreservación de semen equino.**

Actualmente, para la criopreservación se han producido varios diluyentes comerciales que son usados para proveer un ambiente protector para las células espermáticas frágiles. (Aurich y Spersger., 2007; Bedford y otros., 1993). Estos tienen en su composición minerales, nutrientes, agentes crioprotectores y antibióticos generalmente gentamicina (en concentraciones menores a 1g/mL para eliminar la contaminación bacteriana en el eyaculado). Además, estos brindan a las células espermáticas protección contra el choque térmico de las temperaturas críticas, manteniendo así las características del semen y evitan que se produzca alteraciones posibles (Celeghini y otros.,2013; Samper., 2011; Barros y otros., 2008; Captain., 2002). Las sustancias crioprotectoras para el semen congelado son importantes ya que protegen al esperma de los efectos de la congelación y descongelación.

Los crioprotectores que penetran libremente la célula, son sustancias de bajo peso molecular que actúan reemplazando el agua intracelular por medio de la introducción de radicales hidroxilo. Estos sustituyen osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento, además disminuyen el punto de congelación del agua, lo que junto con una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo. Estas sustancias generalmente son alcoholes como glicerol, etilenglicol, 1-2 propanediol, propilenglicol, entre otros (Alvarenga., 2002).

Por otro lado, existen los crioprotectores que no penetran la célula, los cuales protegen el exterior de la membrana celular que es frecuentemente lesionada por el efecto de las altas concentraciones iónicas. Algunas de estas moléculas tienen un efecto reparador de

membrana, por los lípidos que contienen. Los crioprotectores de bajo peso molecular comprenden moléculas como la sacarosa, glucosa, manitol, trealosa y rafinosa, las cuales aumentan la presión osmótica extracelular produciendo la deshidratación de la célula; o pueden ser de alto peso molecular como el polivinil- pirrolidona (PVP), el Dextran, el suero de albúmina bovina, algunos aminoácidos como la L-glutamina, histidina y glicina-betaína (León y otros., 2007; Mac Gann., 1978; Whittingham., 1971).

Los diluyentes más utilizados para la criopreservación de semen equino están hechos de leche en polvo sin grasa, glucosa, y agua estéril; otros diluyentes son a base de yema de huevo o leche descremada. La yema de huevo es el más eficiente de los crioprotectores que no penetran la célula y que protege a los espermatozoides contra el choque térmico, sin embargo no tiene la misma eficacia en todas las especies (Medeiros, 2005).

Se suelen añadir algunos antibióticos a los diluyentes como la Ticarcilina, Timentina (Timentin), Penicilina y Amikacina. Antibióticos como la Gentamicina y la Polymixina B también han sido usados en diluyentes para semen equino pero, éstos tienden a tener un efecto supresor en la longevidad del esperma (Almeida y otros., 2013; Samper., 2009).

El tipo de diluyente que se escoge está basado en el tiempo y temperatura de almacenamiento, y en el tipo de respuesta del semen del padrillo a las bajas temperaturas (Aurich., 2006). A pesar de que la criopreservación de semen equino no es una tecnología instituida, se han propuesto diversas modificaciones para mejorar la técnica y también el uso de diluyentes a base de leche como sustituto al huevo y el uso de amidas en lugar del glicerol (Alvarenga., 2005; Vidament., 2001; Palmer, 1984).

#### **1.10.1. BotuCrio®**

La composición de este diluyente se basa en azúcares, yema de huevo, carbohidratos, aminoácidos, conservantes, penicilina (1.0 g/L), gentamicina (0.5 g/L), excipientes,

crioprotectores, glicerol (en baja concentración), amidas (dimetil- formamida), y agua ultra pura (Nidacon., 2013; Barros y otros., 2008). Debido a su bajo peso molecular las amidas pueden penetrar a través de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides, lo que mantiene la integridad de la membrana y reduce el daño osmótico (Nidacon., 2014; Orozco y otros., 2011., Papa, 2002). (Anexo 2)

#### **1.10.2. EquiPRO®- CryoGuard™ + yema de huevo**

El diluyente EquiPro®CryoGuard™ sin yema de huevo contiene: glicerina y agua bidestilada; además, requiere la adición de yema de huevo fresca (Minitube, 2011).(Anexo3)

## 2. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología moderna ha contribuido con el desarrollo de técnicas y métodos que ayudan en la reproducción de varias especies animales. En la ganadera equina, una de las técnicas más requeridas es la “conservación de semen” ya que permite aprovechar de una manera más eficiente el material genético de animales que tengan características deseables como por ejemplo: tamaño, resistencia, vigorosidad entre otros (Barros y otros., 2008; Ocampo, Restrepo, y Velásquez, 2013; Adji, English, y Haigh, 1993).

La criopreservación es un proceso que tiene varias ventajas como son: evaluación previa de la calidad seminal, reduce los costos asociados al envío de animales vivos, se disminuye la transmisión de enfermedades venéreas; se brinda la capacidad de almacenamiento por periodos largos de tiempo y permite la creación de bancos de material genético de animales que se destacan por sus cualidades y alto valor genético (Barros y otros, 2008; Costa y otros, 2008; Brinsko y otros., 2000). Es importante destacar los avances y progresos obtenidos en países vecinos en el área de la biotecnología de la reproducción relacionada con Equinos. Por ejemplo, en Colombia, los equinos toman mayor importancia cada día, debido a su amplia participación en el trabajo, en actividades deportivas, de exposición y comercialización mundial de material genético criopreservado (Adji y otros.,1993).

Las técnicas actuales de criopreservación de semen equino proporcionan resultados variables debido a los diferentes tipos de diluyentes que se emplean, cuya composición se basa en yema de huevo, leche, amidas y glicerol (Gonzáles y otros., 2009; Alvarenga y otros., 2005; Almeida y otros., 2013; Palmer, 1984; Vidament, 2001).

Actualmente en el Ecuador existe un vacío en la investigación de técnicas de criopreservación de células espermáticas de caballo de Pura Raza Española y el material



seminal no está siendo aprovechado. Por lo tanto, este estudio constituiría el primer reporte de la técnica de criopreservación de células espermáticas de caballos de Pura Raza Española y es un primer paso para dar inicio a la creación de bancos de germoplasma para poder aprovechar la excelente calidad genética de estos caballos, ya que son animales ampliamente difundidos en el Ecuador y el mundo. Los estudios sobre esta raza, se han limitado a las anormalidades morfológicas del esperma; y a la determinación de la duración de la gestación de la yegua (Akourki y otros, 2013). En el Ecuador a pesar de que existen ganaderías equinas importantes con sementales de alto valor genético y comercial no se han hecho muchos estudios sobre técnicas que puedan mejorar la preservación de material seminal como la criopreservación.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Comparar la efectividad de dos diluyentes comerciales para la criopreservación de semen equino (BotuCrio® y EquiPRO® CryoGuard™), en cuatro caballos de Raza Española, con edades entre 6 y 10 años.

### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar parámetros macroscópicos del material seminal: volumen, color, consistencia, olor, pH.
- Medir parámetros microscópicos del eyaculado: motilidad total, supervivencia, anomalías espermáticas previas y pos criopreservación.
- Estimar la efectividad de dos diluyentes, BotuCrio® y EquiPRO® CryoGuard™, para mantener la funcionalidad de los espermatozoides equinos.
- Determinar cuál de los dos diluyentes es el más efectivo para la criopreservación de semen de caballos Pura Raza Española.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

El presente estudio fue realizado con cuatro sementales ubicados en diferentes localidades.

El primero, corresponde a la parroquia el Chaupi, ciudad de Machachi, provincia de Pichincha. El segundo corresponde a la parroquia de Cotogchoa, provincia de Pichincha.

El tercer pertenece a la parroquia Cangagua, ciudad de Cayambe, provincia de Pichincha.

Finalmente, el cuarto semental pertenece a la parroquia Mulaló en la provincia de Cotopaxi.

Las muestras seminales fueron trasladadas hacia las instalaciones del Laboratorio de la empresa BIOGENSA®, en la ciudad de Machachi donde se realizaron los análisis de la calidad seminal macro y microscópicas y posterior criopreservación.

## 5. MATERIALES

### 5.1 Sementales

Cuatro caballos de raza española (entre 6 años y 10 años de edad).

Los sementales de este estudio se encontraban en perfecto estado de salud, cumplían con todos los protocolos sanitarios y tenían un descanso sexual de 30 días en promedio antes del proceso de colecta. (Tabla1)

### 5.2. Campo

- Vagina artificial, modelo Hannover.
- Fundas de inseminación o film transparente para cubrir la cola de la yegua.
- Cuerda, ó pechera, pielera y tapa ojos para inmovilizar a la yegua.
- Fundas vaginales
- Lubricante estéril no espermicida.
- Cinta adhesiva
- Papel aluminio
- Biberón estéril.
- Gasa estéril.
- Gasa para colección de semen porcino.
- Guantes desechables
- Tranquilán® inyectable de uso veterinario
- Envases graduados estériles para la recepción de semen (50mL)
- Agua a 48 -50°C
- Guantes desechables.
- Termómetro.

- Cinta de embalaje.
- Overol
- Botas con punta de acero.
- Yegua.

### **5.3. Transporte**

- Equitainer™ I Tube style (IMV, Estados Unidos)
- Tubos (Corning) de 50mL para Equitainer™ I Tube style.
- Leche descremada UHT.
- Papel aluminio.

### **5.4. Evaluación microscópica en laboratorio**

- EquiPRO® CryoGuard™ w/o antibiotics semen extender. (MOFA)
- BotuCrio® semen extender, 20mL (BOTUCRIO)
- Colorante Eosina-Nigrosina
- Centrífuga (Harmonic Series) para tubos de 15mL.
- Microscopio de luz.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas 10-100µL
- Puntas para micropipeta.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Jeringuillas de 5, 10 y 20mL.
- Tubos graduados Axygen® 15mL
- Cronómetro.

- Tubos (Corning) de 50mL para Equitainer.
- Termómetro.
- Guantes desechables.
- Agua caliente a 37 °C
- Huevos frescos.

### **5.5. Congelación de muestras seminales**

- Jeringa dosificadora.
- Pajuelas para semen (0.5mL).
- Bolas selladoras de pajuelas.
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Cooler adaptado para exposición de pajuelas al nitrógeno líquido.

### **5.6. Almacenamiento de las muestras seminales**

- Tanque con nitrógeno líquido (-196°C) para almacenamiento de pajuelas

### **5.7. Descongelación de muestras seminales**

- Agua a 37 °C
- Pajuelas a evaluarse
- Cronómetro
- Papel absorbente
- Tijeras
- Termómetro.
- Guantes desechables.

## 5.8. Evaluación de las muestras seminales

- Colorante Eosina-Nigrosina
- Microscopio de luz.
- Micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Cámara de Neubauer.
- Guantes desechables.

## **6. MÉTODOS**

### **6.1. Medidas de seguridad del personal**

Es importante destacar que la colecta de material espermático en caballos, es un proceso con un alto grado de dificultad y que representa un peligro elevado para el personal que realiza la colecta, ya que los caballos son animales con gran potencia muscular y pueden causar lesiones graves al personal encargado de su manejo. Además pueden lastimar a la yegua, e incluso se pueden causar lesiones ellos mismos. Debido a estas razones, previo a la colecta el personal usó: casco, botas con punta de acero y overol para garantizar su integridad y seguridad. Además, los caballos fueron manipulados por personal que conoce el comportamiento de cada animal, para tranquilizarlos y poder realizar las colectas.

### **6.2. Preparación del espacio físico**

El área en la que se llevó a cabo la colecta del semen fueron potreros amplios, para permitir que el caballo y la yegua puedan maniobrar y saltar; sin obstáculos y libres de cualquier distracción para el caballo (Adji y otros., 1993).

### **6.3. Preparación, estímulo del semental**

El semental fue llevado cerca de la yegua tranquilizada con el objetivo de que sea estimulado con mayor rapidez. Una vez estimulado, y cuando el pene estuvo totalmente protruido se lo alejó de la yegua y se procedió a lavar el pene con agua tibia. Esto permitió eliminar el esmegma u otros detritus presentes en la superficie del pene (Adji y otros., 1993).

### **6.4. Preparación de la yegua**

Para los procesos de colecta se seleccionó una yegua disponible en los distintos sitios de colecta. Previo a la colecta, la yegua fue tranquilizada con una dosis de 1mL de



Tranquilán® (maleato de acepromazina) inyectable de uso veterinario. Una vez tranquilizada, se colocó una traba a nivel de la cuartilla de uno de los miembros posteriores, utilizando para esto una cuerda ancha para evitar lastimar las patas del animal; se cubre los ojos en caso de ser necesario, moquillo, pechera y pialera. Después, se vendó la cola de la yegua con un guante de inseminación o film transparente y cinta adhesiva. Se esperó 15 minutos a que el tranquilizante haga efecto (Castelo y otros., 2014 ; Barros y otros., 2008; Laboratorios Zoo, 2013).

### **6.5. Armado de la vagina artificial**

Para realizar las colectas de material seminal, se utilizó una vagina artificial tipo Hannover. Ya que la misma vagina artificial fue utilizada para todos los sementales, durante su armado se procedió a colocar y retirar (antes y después de cada colecta) una funda vaginal. La funda vaginal se sujetó a un extremo de la vagina con cinta adhesiva, y además se colocó dos cintas de caucho por fuera de la funda vaginal y sobre la cinta adhesiva para dar mayor seguridad y evitar que esta se afloje durante la colecta (Miró y otros., 2006; Captain, 2002; Santos, 2014).

En el extremo distal de la vagina artificial, se colocó un frasco de colecta (biberón), el cual fue cubierto con papel aluminio y cinta adhesiva para proteger el semen de la luz. Se colocó una gasa estéril en la punta del biberón, sujetado con cinta adhesiva, para poder separar la porción gelatinosa de la porción espermática del eyaculado, y además poder eliminar objetos extraños como pelo, tierra, suciedad y esmegma. Luego, se procedió a llenar la vagina artificial con agua a una temperatura inicial entre los 48 °C y 50° C. Finalmente, la porción proximal de la vagina artificial se lubricó con gel no espermicida y se cubrió este extremo con papel aluminio, hasta el momento de la colecta, para evitar que ingresen elementos extraños (Miró y otros., 2006; Captain, 2002; Santos, 2014).

## **6.6. Colecta del material seminal**

Luego de que se limpió el pene, se volvió a acercar el semental a la yegua para que este se estimule, se le permitió reconocer a la yegua y cuando el pene estuvo totalmente erecto y protruido, se dejó que monte a la yegua. El pene fue desviado hacia el interior de la vagina artificial para que el caballo pudiera eyacular con facilidad.

Se sostuvo la vagina artificial en una posición ligeramente elevada para simular el ángulo del tracto reproductivo de la yegua. Inmediatamente después de la eyaculación, se vació aproximadamente dos tercios de agua de la vagina artificial, para disminuir la presión y facilitar el drenaje del semen. Cuando, el pene del caballo empezó a perder tono y empezó a retroceder, se bajó lentamente la vagina artificial hasta que fue colocada en una posición casi vertical al final del proceso. El semen colectado cayó en tubos graduados (biberones estériles). Finalmente, se alejó al caballo de la yegua.

Para la recolección de la segunda muestra de material seminal, se esperó aproximadamente 30 minutos a partir de la primera colecta. Una vez transcurrido este tiempo se volvió a estimular al semental y se procedió de igual manera que para la primera colecta.

## **6.7. Evaluación Macroscópica del material seminal**

Se registró datos de la calidad de cada eyaculado como: color, olor, consistencia, volumen (mL); presencia/ ausencia de sangre u orina y pH (Melo y otros., 2007).

## **6.8. Dilución del semen fresco para transporte**

Se calentó leche descremada (UHT) a 37 °C; la muestra de semen colectada fue vertida en un tubo estéril, previamente calentado, y se diluyó en proporción 1:1 con la leche, esta se añadió lentamente por un lado del envase de tal manera que se añadió ¼ de diluyente a la vez y se mezcló suavemente. Se mantuvo la muestra en baño María, a 37 °C, hasta que su

temperatura descendiera gradualmente hasta temperatura ambiente. Luego se colocó la muestra en el Equitainer™ I Tube style para su transporte hasta el laboratorio. La leche fue usada como diluyente para transportar el semen desde el lugar de colección hasta el laboratorio (Santos, 2014).

### **6.9. Empacado de la muestra seminal**

Para evitar que existan filtraciones se colocó cinta de teflón en la parte superior del tubo que contenía la muestra, y se lo cerró firmemente. Con un marcador permanente, se etiquetó el tubo con el nombre del caballo, número de muestra, día y hora de la colecta.

La muestra etiquetada se colocó en uno de los pocillos del envase isotérmico (Isothermalizer) y se procedió a cargar el Equitainer I, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para que la temperatura de la muestra descienda gradualmente hasta una temperatura de 5 °C (Hamilton Research, 2002).

## **Laboratorio**

### **6.10. Evaluación de motilidad total**

Para la evaluación microscópica se obtuvo una muestra pequeña (aproximadamente 50µL) con una micropipeta. La motilidad total se evaluó a través de microscopio de luz. Se evaluó cinco campos diferentes a 40X; se anotaron las observaciones en una escala de 0-100% (Melo y otros., 2007; Santos, 2014; Almeida y otros., 2013; Ocampo y otros., 2013).

### **6.11. Concentración espermática**

Para determinar la concentración espermática, se utilizó la Cámara de Neubauer. Se contó las células espermáticas de 5 cuadros grandes y para establecer la concentración se utilizó la fórmula del fabricante. Los resultados se anotaron en  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ mL (Celeromics, 2013; Almeida y otros., 2013).

## **6.12. Determinación de vivos/muertos- Tinción eosina- nigrosina**

En un portaobjetos, previamente calentado a 37°C o 38°C, se colocó una gota de 20-50µL de semen con una gota del mismo volumen de eosina-nigrosina, la cual se incubó por 30 segundos. Una vez transcurrido ese tiempo, se extendió la muestra a lo largo de todo el portaobjetos con ayuda de un cubreobjetos delante de la gota. Luego se añadió una gota de aceite de inmersión para el análisis. Se evaluó 100 espermatozoides a una magnificación de 100X con aceite de inmersión. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como “vivos”, y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como “muertos” (Melo., 2007; Santos, 2014).

## **6.13. Evaluación de la morfología espermática**

Se evaluó la morfología o estructura del espermatozoide con un microscopio de luz a una magnificación de 100x. Se evaluó 100 espermatozoides para evidenciar defectos morfológicos, empleando el mismo método que para la evaluación de vivos/muertos. Se anotó el porcentaje de anomalías en la cabeza, parte, media y cola de los espermatozoides (Adji y otros., 1993).

## **6.14. Previo a la Criopreservación**

### **6.14.1. Preparación del diluyente EquiPRO® CryoGuard™**

Se separó, cuidadosamente yema de huevo fresca; y para retirar el exceso de la clara de huevo se utilizó papel absorbente. Con ayuda de una jeringuilla, se pinchó la yema y se colectó únicamente el líquido interno y se vertió la misma en un envase estéril hasta alcanzar un volumen de 60mL. Al diluyente (240mL) se le agregó los 60mL para un volumen final de 300mL. Se ajustó la temperatura del diluyente, mediante refrigeración, a la temperatura del semen después de centrifugar (Minitube, 2010).

### 6.14.2. Preparación del diluyente BotuCrio®

El diluyente BotuCrio®, se mantuvo almacenado a -20°C, se lo descongeló únicamente para su uso, éste permaneció durante 20 minutos a 5°C previo a su uso (Nidacon, BotuCrio, 2013).

### 6.15. Dilución de las muestras en medio crioprotector

Cuando las muestras seminales almacenadas en el Equitainer I alcanzaron los 5°C, se las colocó en tubos graduados de 15 mL para centrifugar. Las muestras se centrifugaron a 2200 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lo vertió en otro tubo estéril de 15 mL para ser centrifugado nuevamente a 2400 rpm por 5 minutos.

El sedimento (*pellet*) fue resuspendido con el diluyente correspondiente (BotuCrio® / EquiPRO® Cryoguard), y dependiendo de la concentración espermática inicial. Una vez se determinó la relación de dilución, se añadió lentamente, por un lado del envase, la cantidad de diluyente apropiada al semen. Se añadió  $\frac{1}{4}$  de diluyente a la vez, y se mezcló suavemente con ayuda una jeringa estéril. Los *pellets* resuspendidos de cada eyaculado fueron vertidos en un tubo de 15 mL y llevados a refrigeración a 4°C durante 15 minutos (Orozco y otros.,2011).

### 6.16. Criopreservación

Una vez transcurrido el tiempo de refrigeración, se llenó las pajuelas de 0.5mL con ayuda de jeringuillas, dejando un espacio de aire para poder sellarlas con bolas de vidrio de sellado. Las pajuelas llenas y selladas fueron sometidas a vapores de nitrógeno líquido por 12 minutos, colocadas de manera horizontal, a 4 cm de la superficie de este en un recipiente apropiado para este proceso. Una vez transcurrido este tiempo, se sumergieron

inmediatamente en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y finalmente se las almacenó en un tanque de almacenamiento (Ocampo y otros., 2013; Orozco y otros., 2011).

### **6.17. Evaluación poscongelación**

Para poder evaluar la calidad espermática pos congelación y comparar los resultados de los dos diluyentes; se descongeló 1 pajuela de cada medio de la criopreservación por baño María. Se sumergieron las pajuelas en agua a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. Se registró porcentajes de motilidad espermática total, concentración, supervivencia (vivos/muertos); y anormalidades espermáticas (Castelo y otros., 2014; Barros y otros., 2008; Adji y otros., 1993; Almeida y otros., 2013).

### **6.18. Diseño experimental**

En el presente proyecto se manejaron 3 factores: A (Edad: 6 y 10 años), B (Medio: BotuCrio® y EquiPRO®CryoGuard™) y C (Congelación: Evaluación de parámetros antes de la congelación y evaluación de parámetros después de la congelación).

Se utilizó un Diseño Experimental Completamente Aleatorizado (DCA) y el mismo diseño con arreglo factorial de dos niveles y tres factores  $2^3=8$  tratamientos y dos repeticiones.

### **6.19. Análisis Estadístico**

Para analizar los resultados obtenidos de las diferentes muestras se realizaron análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Minitab 14. El ANOVA de una vía permitió ver si existe una diferencia significativa en las medias de los datos de las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados. Por otro lado, el ANOVA con arreglo factorial permitió determinar si las características microscópicas de los eyaculados se ven influenciadas significativamente por la interacción entre la edad del caballo y el diluyente utilizado.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Características Macroscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.**

Las muestras seminales de los cuatro sementales mostraron un color blanquecino opaco. El volumen de eyaculado de los sementales varió entre 17 ml y 40ml, con un volumen promedio de 25.87 ml. Adicionalmente, se observó ausencia de sangre y orina en todas las muestras. El pH de los eyaculados varió entre 7,1 y 7,6 con un promedio de pH de 7.3. Los eyaculados de los caballos “Destinado” y “Legendario” presentaron un olor característico. El eyaculado del semental “IN Julius” tuvo un olor suigeneris y el eyaculado del semental Trinchero fue indoro. La consistencia de los eyaculados fue líquida/ cremosa, excepto en el caballo Trinchero el cual mostro material seminal altamente viscoso. (Tabla 2) Finalmente, el ANOVA de una vía mostró que no hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a los volúmenes de los eyaculado obtenido de los cuatro caballos. (Tabla 3).

### **7.2. Características Microscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación.**

Los eyaculados de los cuatro caballos mostraron una motilidad que fluctuó entre 55% y 75%, con un promedio de 65%. Las concentraciones espermáticas de las muestras seminales variaron entre  $110 \times 10^6/\text{mL}$  y  $360 \times 10^6/\text{mL}$ , con un promedio de  $227,5 \times 10^6/\text{mL}$ . El porcentaje de células espermáticas vivas de las muestras seminales varió entre el 50%-70%, con un promedio de 60%. Por otro lado, se observó un porcentaje de alteraciones morfológicas que varió entre, 4%-17%, con un promedio de 10,38%.(Tabla 4).

El ANOVA de una vía mostró que si hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la concentración, motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y alteraciones morfológicas de los eyaculados de los cuatro caballos. (Tabla 3).

Al separar las muestras seminales de los cuatro caballos por edades, se observó una motilidad promedio de 62.5% en los sementales de 10 años, y una motilidad promedio de 67,5% en los caballos de 6 años. En lo que se refiere a concentración espermática de los eyaculados, los sementales de 10 años mostraron una concentración promedio de  $152,5 \times 10^6/\text{mL}$ , y los caballos de 6 años tuvieron un promedio de  $302,5 \times 10^6/\text{mL}$ . Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras seminales para ambas edades (10 y 6 años) fue de 60%, y el porcentaje restante corresponde a las células espermáticas muertas. Finalmente, el porcentaje de alteraciones morfológicas de las células espermáticas de los caballos de 10 años fue en promedio 13,5%, y para los sementales de 6 años fue de 7,25%. (Tabla 4).

### **7.3. Características Microscópicas de los eyaculados Luego de la Criopreservación con el Medio- BotuCrio®.**

Respecto a las características microscópicas después de la criopreservación con el medio BotuCrio® se obtuvieron los siguientes resultados: los eyaculados de los cuatro caballos mostraron una motilidad entre 20%- 65% dando un promedio de 48,13%. En cuanto a la concentración espermática, todos los eyaculados mostraron un valor de  $40 \times 10^6/\text{mL}$ . Después de la crioconservación con este diluyente el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras seminales estuvo entre 20%-60% dando un promedio de 39,5% y el porcentaje promedio restante (60,5%) corresponde a los espermatozoides muertos. Por último, las alteraciones morfológicas en las células espermáticas tuvieron porcentajes entre el 14% -31 con un promedio de 22.75%(Tabla 5)



El ANOVA de una vía mostró que si hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos de los 4 sementales. Sin embargo en las alteraciones morfológicas no se observó una diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) de los eyaculados de los cuatro caballos. (Tabla 6)

Al separar las muestras de los eyaculados por edades de los caballos se observaron las siguientes características: se notó una motilidad en promedio de 41.25% para los caballos de 10 años y para los caballos de 6 años la motilidad fue de 55%. En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos, los sementales de 10 años mostraron un 34%, y los caballos de 6 años tuvieron un 45%; los porcentajes restantes corresponden a las células espermáticas muertas. Por último, el porcentaje de alteraciones espermáticas en los caballos de 10 años fue de 26,5%, y en los caballos de 6 años se observó un 19% de anomalías. (Tabla 5)

#### **7.4. Características Microscópicas de los eyaculados Luego de la Criopreservación con el Medio- EquiPRO® CryoGuard™.**

Después de la crioconservación con el medio EquiPRO® CryoGuard™ las muestras seminales evaluadas de los cuatro caballos mostraron las siguientes características microscópicas: la motilidad espermática estuvo entre 10% - 45% con un promedio de 23,38%. Con respecto a la concentración, ésta fue de  $40 \times 10^6$ /mL para todas las muestras seminales. Por otro lado, el porcentaje de células espermáticas vivas luego de la criopreservación con el mencionado medio estuvo entre 7%-30% y en promedio 15,88%. El porcentaje promedio restante (84,13%) corresponde a los espermatozoides muertos. Finalmente, las alteraciones morfológicas para las muestras seminales estuvieron entre 36,5%- 58%, con un promedio 45,25%.(Tabla 7)

El ANOVA de una vía mostró que si hubo una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos de los 4 sementales. Sin embargo en las

alteraciones morfológicas no se observó una diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) de los eyaculados de los cuatro caballos. (Tabla 8)

Con respecto a las características microscópicas después de la criopreservación con el medio EquiPRO® CryoGuard™ y separadas por edades de los caballos se obtuvo que: los caballos de 10 años mostraron en promedio una motilidad de 14,25% y los caballos de 6 años una motilidad promedio de 32,5%. En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos, los sementales de 10 años mostraron un 11,75% y los caballos de 6 años un promedio de 20%. Los porcentajes promedio restantes 88,25% y 80% corresponden a los espermatozoides muertos para los caballos de 10 años y 6 años respectivamente. Por último, los porcentajes de alteraciones morfológicas para los caballos de 10 años fue en promedio de 49,75% y para los caballos de 6 años de 40,75%. (Tabla 7)

### **7.5. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas luego de la criopreservación**

Los resultados obtenidos de las características microscópicas de los eyaculados después de la criopreservación con los dos diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™ muestran que la interacción entre caballos y diluyentes si fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) para la motilidad espermática y porcentaje de espermatozoides vivos. En el caso del porcentaje de alteraciones morfológicas de los espermatozoides no hubo diferencia significativa ( $P \geq 0.05$ ) en la interacción entre caballos y diluyentes. (Tabla 9)

### **7.6. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas por edades luego de la criopreservación.**

Los resultados obtenidos del ANOVA para las características microscópicas de los eyaculados después de la criopreservación con los dos diluyentes BotuCrio® y

EquiPro®CryoGuard™ muestran que la interacción entre edades y diluyentes no fue significativa ( $P \geq 0.05$ ) para la motilidad espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y alteraciones morfológicas de las células espermática. (Tabla 10)

## **8. DISCUSIÓN:**

### **8.1. Evaluación de calidad del eyaculado**

Los datos del presente estudio muestran que los sementales de entre 6 años presentaron mayor volumen (27,5ml y 35ml) en comparación con los sementales de 10 años (22,5ml y 18,5ml) (Tabla 2). Estos valores concuerdan con la literatura en la que se menciona que en los equinos volumen seminal varía entre 20-60 mL; lo que depende del reproductor y el número de colectas que se realicen por semana (Palma, 2001; Gonzáles & Ospitia, 2011) (Anexo 1) Por otro lado, estudios de Castelo y otros. (2014) y Akourki y otros. (2013) mencionan que los eyaculados de bajo volumen pueden estar relacionados al régimen de entrenamiento para competencias deportivas. Esto concuerda con los sementales de este estudio ya que realizan actividades que demandan bastante energía como: rejoneo, alta escuela, evaluaciones morfológicas y exhibiciones. Adicionalmente, esto puede deberse a que la calidad del semen de caballo depende, no solamente del animal, sino de otros factores como: edad del animal, el intervalo entre colectas, y la estación (Akourki y otros., 2013).

### **8.2. Evaluación de la criopreservación analizada por motilidad**

En cuanto a motilidad total de las células espermáticas para semen fresco, antes de la criopreservación evaluada en los 4 caballos, en escala de 0-100%, se encontró que la media para los caballos fue de 65%. (Tabla 4) Estos resultados son similares con los obtenidos en el estudio de Álvarez y otros. (2011), en el cual se evaluaron caballos de Pura Raza Española, Pura Raza Árabe y de Raza Bretona (7 y 15 años) y se encontraron motilidades para semen equino fresco de 60%. Siendo este valor similar al hallado en esta investigación. Esto puede deberse a que los grupos de estudio, de la presente investigación y la de Álvarez y otros. (2011) son similares en cuanto a raza y edades. Adicionalmente,

los valores del presente estudio son similares a los de Castelo y otros.(2014) quien trabajó con las razas Cuarto de Milla y Mangalarga Marchador las cuales presentaron porcentajes de motilidad de 67.5% y 62.9% respectivamente. Mientras que en un estudio realizado en Sudamérica con caballos Criollos colombianos se encontró una motilidad de 83.3% en semen fresco la cual es diferente a la encontrada en este estudio, esto puede deberse a la diferencia en las características innatas de las diferentes razas (Ocampo y otros., 2013).

Al comparar la motilidad espermática de los eyaculados previa a la criopreservación (65%) y luego de la criopreservación con el diluyente BotuCrio® (48,13%) se puede observar una disminución en la motilidad (Tabla 11). En el estudio Castelo y otros. (2014) se menciona que el uso de diluyentes que contienen amidas (dimetil-formamida) como crioprotector, como por ejemplo BotuCrio®, minimiza los daños osmóticos en las células espermáticas durante el proceso de criopreservación brindando mejores resultados en los valores de motilidad total después del descongelamiento. El estudio de Orozco y otros. (2011) realizado con un diluyente que contiene amidas determinó una motilidad de 44.96% la cual es similar al encontrado en el presente estudio (48,13%).

En este estudio las muestras seminales criopreservadas con el medio BotuCrio®, mostraron una mejor motilidad promedio de 48.13%, mientras que con el diluyente EquiPro® CryoGuard™ la motilidad promedio fue de 23.38%. Esto concuerda con el estudio de Orozco y otros. (2011) en el que se menciona que a pesar de que la viabilidad espermática del semen criopreservado se mantiene después de la descongelación, también existe un alto porcentaje de sementales (20-40%) cuyos espermatozoides responden pobremente a la criopreservación, por lo que se debe evaluar el porcentaje de motilidad espermática de cada eyaculado después de realizar la dilución y congelación.

Por otro lado, al comparar la motilidad espermática de los eyaculados previa a la criopreservación (65%) y luego de la criopreservación con el diluyente EquiPro® CryoGuard™ (23,38%) se puede observar una disminución drástica en la motilidad (Tabla 11). Estudios de Alvarenga y Papa. (2011); Gomes y otros. (2002) y Alvarenga y otros. (2002) sugieren que el uso de diluyentes que contienen glicerol como crioprotector, como por ejemplo EquiPro® CryoGuard™, presentan en promedio una motilidad de 30% lo que concuerda con el presente estudio.

Al comparar la motilidad espermática obtenida con el diluyente BotuCrio® y con EquiPro® CryoGuard™ luego de la criopreservación se observa una superioridad del diluyente BotuCrio®; esto podría deberse a la presencia de amidas en este diluyente al contrario de EquiPro® CryoGuard™ el cual contiene glicerol. Las amidas permiten que exista una mayor permeabilidad y menor estrés osmótico, lo que permite preservar de mejor manera la integridad de la membrana plasmática.

Por otro lado, el glicerol causa daños principalmente a nivel de la membrana mitocondrial, plasmática y acrosomal por la desnaturalización de las proteínas, además de ser un producto tóxico para los espermatozoides si está en una concentración excesiva por lo que se debe disminuir su concentración, y el tiempo de contacto con el espermatozoide antes del congelamiento, para maximizar los efectos benéficos del glicerol como crioprotector (León y otros., 2007; Magistrini y otros., 1999; Ball y otros., 2006; Alvarenga y otros., 2005).

Asimismo, la motilidad poscongelación puede disminuir debido a la variabilidad que existe entre eyaculados de los sementales (Castelo, y otros, 2014; Alveranga y otros., 2002; Alvarenga y otros., 2000; Bonadonna., 1989; Morilla de Mina, 1999; Barros y otros., 2008; Oliveira y otros., 2013). De igual manera la investigación realizada por Castelo y

otros.(2014) en la raza de caballos Mangalarga Marchador con el diluyente BotuCrio® mostró mejor motilidad.

El estudio de Dickson (2003) determinó que la temperatura óptima para mantener la motilidad espermática y fertilidad de semen refrigerado es de 4 a 6 °C. Sin embargo, existe otro estudio de León y otros.(2007) que indica que las temperaturas de 15 a 20 °C son óptimas para mantener la motilidad espermática y fertilidad cuando se almacena el semen de 4-12 horas. Ya que en el presente estudio no se mantuvo las muestras seminales a 4°C por más de 6 horas se procedió a almacenar las muestras seminales a temperatura de refrigeración entre 4-6°C, y luego se añadió los respectivos diluyentes, los cuales tenían una temperatura de 4°C.

Asimismo, investigaciones de Hoffmann y otros. (2011); Ocampo y otros.(2013) establecen que las diferencias en los porcentajes de motilidad pueden deberse a la calidad del semen sometido a la criopreservación la cual puede tener una alta variabilidad entre los reproductores, inclusive entre los eyaculados de un mismo reproductor. Además, la calidad también depende de los espermatozoides ya que estos cambian su comportamiento en respuesta a cambios ambientales y de almacenamiento. Esto concuerda con los sementales de este estudio ya que la motilidad previa y poscongelación mostró una variación significativa ( $P \leq 0.05$ ). Es probable que los cambios en el patrón de motilidad de los espermatozoides reflejen las sutilezas del proceso y lo delicadas que son las células espermáticas (Araújo y otros., 2008; Abaigar y otros., 2001; Ball y otros., 2001). (Tablas 3,6,8)

En el semen diluido, cuando hay un enfriamiento lento del semen hasta los 5°C, ocurre un metabolismo anaeróbico inducido por el agotamiento de oxígeno. El resultado de este metabolismo es la acumulación de ácido láctico; cuando éste aumenta hace que exista una

reducción del pH en el medio y consecuentemente una reducción en la motilidad del espermatozoide ya que disminuye su metabolismo y existe una producción de ATP (Amann y Graham, 2011). Por lo tanto, la motilidad espermática en este estudio, pudo haber sido influenciada por la variación en la temperatura desde el momento de la colecta hasta la etapa de enfriamiento en el Equitainer™ I Tube style donde la temperatura de la muestra descendió hasta los 6 °C. En el momento de la colecta, la variación en la velocidad de disminución de la temperatura pudo haberse visto influenciado por las condiciones ambientales, fechas y lugares de colecta, ya que en días más fríos la temperatura desciende aceleradamente en un corto intervalo de tiempo, mientras que en días más templados, la temperatura desciende lentamente en un mayor rango de tiempo. El método utilizado en el presente estudio es similar al usado por Dickson. (2003), donde se reportó que el esperma puede ser enfriado rápidamente de 37°C a 20°C. Y para maximizar la motilidad espermática, se usó una tasa de enfriamiento de -0.05 a 0.1 °C/ minuto entre 20 y 5 °C. En este estudio, esto se logró mediante el uso del Equitainer™ I Tube style, este contenedor usa una velocidad de enfriamiento (-0.3°C) similar a la del estudio mencionado (Captain, 2002). En algunos casos, aun cuando se emplean técnicas óptimas del manejo de semen, un número insuficiente de células espermáticas sobreviven al proceso de enfriamiento y almacenamiento (León y otros., 2007; Dickson, 2003).

Además, las diferencias en motilidad espermática en diferentes estudios, se pueden deber al uso de diferentes protocolos de criopreservación, composición de los diluyentes, la raza y origen de los sementales de los estudios, incluso, a la calidad del semen sometido a la criopreservación, la cual está ligada a la alta variabilidad existente entre los eyaculados de un mismo animal reproductor, y entre eyaculados de diferentes animales (Ocampo y otros., 2013; Hoffmann y otros., 2011; Dickson, 2003).



### **8.3. Evaluación de la concentración previa a la criopreservación**

Luego del Análisis de varianza (ANOVA) se determinó que si existe una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la concentración espermática de las muestras seminales. (Tabla 3) Akourki.(2013) menciona que la media de espermatozoides por eyaculado es relativamente más alta cuando hay un periodo de descanso de más de 6 días; los sementales de presente estudio concuerdan con la información del estudio mencionado, ya que los caballos del presente estudio tuvieron más de 6 días de descanso de actividad sexual y en la colecta seminal mostraron una media de  $227,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Además, las características seminales pueden estar influenciadas por la edad del semental, el tamaño testicular, el intervalo entre eyaculaciones y la estimulación sexual antes de la eyaculación (Pycoc, 2012; Miró y otros., 2006). Esto concuerda con los sementales de este estudio, ya que los sementales de menor edad mostraron un promedio de 302.5 millones de espermatozoides/mL superior a los 152.5 millones de espermatozoides/mL de los sementales de 10 años. (Tabla 4) El estudio de Akourki y otros. (2013) menciona que la espermatogénesis y la espermiogenesis requieren a proximadamente 67 días en los padrillos; y la frecuencia de eyaculación es uno de los factores más importantes que afectan la emisión del esperma. Además, de acuerdo con Pycoc. (2012) el número de espermatozoides en el segundo eyaculado de un semental que ha estado sexualmente inactivo por lo general es de aproximadamente el 50% del número obtenido en la primera eyaculación.

### **8.4. Evaluación vivos/muertos antes y después de la criopreservación**

En el presente estudio el promedio total de espermatozoides vivos previos a la criopreservación fue de 60% para los cuatro caballos, mientras que el promedio total para el medio BotuCrio® de espermatozoides vivos fue de 39.5% y para el medio EquiPro®

CryoGuard™ fue de 15.88%. (Tabla 11). Estos resultados, en cuanto a la resistencia de los espermatozoides al congelamiento, posiblemente se deban a factores genéticos; ya que por ejemplo, las razas brasileras Mangalarga Paulista y Mangalarga Marchador, al igual que la raza Española son las que tienen menor resistencia al proceso de congelación (Alvarenga y otros.,2002).

En un estudio se encontró que, a pesar de que existen avances en la congelación de semen equino, todavía existe un limitante en el desarrollo de esta biotecnología; la sobrevivencia espermática después de la congelación en promedio es de 50% (León y otros., 2007), esto se debe a los efectos ejercidos por los cambios de temperatura, alteraciones de la membrana y los daños que se producen por las concentraciones elevadas de crioprotectores (Orozco y otros., 2011; Brinsko y Varner ., 1992). Además, las proteínas de la membrana plasmática son las responsables de ayudar en la supervivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo. Los daños en la estructura pueden llevar a la pérdida de la homeostasis y posterior muerte celular, inutilizando a la célula espermática (Amann & Graham, 2011).

Además, factores como la congelación puede desencadenar la cristalización de los lípidos y la agregación de proteínas, la cual es una condición de daño irreversible durante la descongelación. Además, la membrana puede sufrir separación de lípidos y un reordenamiento de los componentes de la membrana, además de inestabilidad durante la congelación (Celeghini y otros., 2013; Ball y otros., 2006). Otro factor, es la variación en la congelación del semen entre reproductores, donde algunos toleran más la congelación de su material seminal en comparación con otros; estas diferencias en la habilidad de los espermatozoides de resistir la criopreservación existe no solamente entre especies sino entre individuos dentro de una misma especie, las cuales posiblemente se deben a diferencias inherentes en la bioquímica del esperma y el metabolismo entre especies y

individuos dentro de la especie (Graham y Loomis, 2008; León y otros., 2007; Darin y otros., 1977; Ganheim y otros., 1994). Lo cual concuerda con los resultados de los sementales de este estudio, donde hubo una varianza significativa en cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos después del proceso de criopreservación lo que evidencia la diferencia de resistencia de sus células espermáticas; y esta podría ser una razón por la cual existen varios protocolos y condiciones para congelar semen equino (Abdolhossei y otros 2011).

### **8.5. Evaluación de alteraciones morfológicas antes y después de la criopreservación**

A pesar de que existan las condiciones ideales, es inevitable que ocurran algunos daños y alteraciones morfológicas a los espermatozoides durante el proceso de congelación. Esto se debe a la formación interna de cristales de hielo (lo cual altera la estructura espermática) y el incremento de la concentración de solutos posiblemente a niveles tóxicos, mientras el agua sale forma hielo dentro y fuera de la célula (Orozco y otros., 2011; More, 2006; Lodge y otros., 1978). Además, uno de los factores que desencadenan la cristalización de los lípidos y la agregación de proteínas presentes en la membrana, es el enfriamiento del semen, lo que puede llevar a una inestabilidad en la membrana plasmática (Celeghini y otros., 2013). En el presente estudio se usó crioprotectores como son las amidas y/o glicerol para prevenir algunos de estos daños, como se muestran los resultados de las muestras criopreservadas con el medio BotuCrio®, las cuales mostraron un 22.75% de alteraciones totales, las cuales son significativamente menores comparadas con el 45.25% de alteraciones para el medio EquiPro® CryoGuard™. (Tabla 11)

En el presente estudio el porcentaje promedio de alteraciones espermáticas (10,38%) en semen fresco de los cuatro caballos previo a la criopreservación es baja en comparación

con otras razas como por ejemplo: la raza Cuarto de Milla (25,86% alteraciones), Mangalarga Marchador (30.35% alteraciones) y en la raza Pantanero (23,31% alteraciones). (Castelo y otros., 2014). Estas variaciones en porcentajes de alteraciones morfológicas espermáticas son atribuidas a características innatas de los sementales y a la selección natural por la que estos caballos han pasado. También, los defectos en la calidad seminal pueden estar relacionados con las actividades deportivas intensas y el manejo nutricional diferenciado para estos caballos (Castelo y otros., 2014).

### **8.6. Plasma seminal y centrifugación**

Investigaciones indican que gran parte del plasma seminal o porción mucogelatinosa es eliminado durante la centrifugación para la preparación de la muestra previa la criopreservación. Este procedimiento es necesario para concentrar el semen y remover el plasma seminal y sus posibles efectos nocivos. En los caballos la cantidad adecuada de plasma es beneficiosa mientras que el exceso del mismo puede ser perjudicial para la criopreservación. Un estudio indica que a pesar de que casi todo el plasma seminal es descartado durante el congelamiento del semen, queda una porción la cual contiene proteínas que permiten la regeneración de la superficie espermática, el establecimiento de reservas de espermatozoides en el oviducto, la modulación de la capacitación, y la interacción entre gameto, la regulación de la respuesta inflamatoria y la protección de los espermatozoides en el útero (Hundrieser y otros., 2005; Sieme, 2009; Costa y otros., 2008; Aurich y otros., 1998; Aurich y otros., 1996)

En la presente investigación, la muestra del semental Trincherazo presentó una abundante porción mucogelatinosa a diferencia de las muestras de los demás caballos que tuvieron poca fracción mucogelatinosa. Al evaluar la motilidad espermática después de la criopreservación, en esta muestra se observó que no se eliminó por completo la porción

mucogelatinosa lo cual afecto la motilidad debido a la aglutinación de espermatozoides. Las diferencia en la cantidad de plasma presente en diferentes sementales podrían explicar las variaciones en la capacidad de congelamiento del eyaculado entre sementales

## 9. CONCLUSIONES

- En este estudio los mejores resultados de la criopreservación de semen de caballos de Pura Raza Española se dio usando el diluyente BotuCrio® en caballos de entre 6 y 10 años de edad.
- En esta investigación el diluyente BotuCrio ® brindó mejores resultados en todas las pruebas de valoración seminal en la evaluación después de la criopreservación.
- La alta variabilidad entre los reproductores, inclusive entre los eyaculados de un mismo reproductor determina la concentración espermática, volumen de eyaculado, motilidad total espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y alteraciones en los espermatozoides.
- La capacidad de resistencia de las células espermáticas de cada animal y la composición de los dos diluyentes utilizados determinan las diferencias en la motilidad total espermática, porcentaje de células espermáticas vivas y anomalías en el espermatozoide después del proceso de criopreservación.
- Determinar las causas del daño a las células espermáticas durante la criopreservación es arduo ya que el éxito de la criopreservación depende de varios factores, como la interacción entre diluyente, la tasa de enfriamiento, edad, raza, alimentación del animal y las actividades que realiza cada animal.
- El proceso de criopreservación de células espermáticas equinas no está estandarizado; de igual manera como existen diversos tipos de animales, también existen una amplia variedad de diluyentes para la congelación; por lo que es poco realista asumir que los espermatozoides de todos los sementales deben ser congelados de la misma manera.

## 10. 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.
- En el caso del diluyente EquiPRO® CryoGuard™, se recomienda filtrar la yema de huevo fresca que se va a utilizar; o evaluar el uso de distintos volúmenes de la misma, que el recomendado por la casa comercial, para así poder evaluar si de esta manera se obtienen mejores tasas de supervivencia de las células espermáticas luego de la criopreservación.
- Se recomienda continuar con más estudios en el campo de la criopreservación de células espermáticas de caballo de Pura Raza Español, ya que este sería un primer paso para la creación de un banco de germoplasma de estos animales en el Ecuador.
- Se recomienda el uso del diluyente BotuCrio® para la criopreservación de células espermáticas de caballos de Pura Raza Español.

## 11. Referencias

- Borque, C., De la Fuente, J., Delclaux, M., Martínez, E., Oter, M., Palasz, A., . . . Talavera, C. (2006). Post-Thaw Viability Of European Bison (*Bison Bonasus*) Semen Frozen With Extenders Containing Egg Yolk or Lipids of Plant Origin and Examined With a Heterologous in Vitro Fertilization Assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(2), 116-125. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/pdfplus/20096570.pdf?acceptTC=true&jpdConfirm=true>
- Abaigar, T., Cano, M., Holt, W., & Pickard, A. (2001). Use of computer- assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor azelles (*Gazella dama mhorr*): effects of body weight, electroejaculation technique and short- term semen storage. *Reproduction*, 122, 265-273.
- Abdolhossein, S., Ahmad, M., Hiva, D., Hormoz, H., Masoud, A., Mina, M., . . . Seied, M. (2011). Pregnancy in the Caspian Miniature Horse Using Frozen Semen Cryopreserved with the EquiPRO CryoGuard Freeze Medium and Customized Freezing Protocols. *Journal of Equine Veterinary Science.*, 266-271.
- Acosta , M., Parejo , J., & Rodríguez, I. (1992). El caballo español de estirpe cartujana en américa. *Archivos de Zootecnia*, 41(154), 349-354.
- Adji, D., English, A., & Haigh, J. (1993). Comparison of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24(4), 454-458. From <http://www.jstor.org/stable/20095306>
- Affoso, F., Alonso, M., Arruda, R., Carvalho, H., Celeghini, E., Jaimes, J., . . . Silva, D. (2011). Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. *Revisa Brasileira de Reprodução Animal*, 35(2), 145-151.
- Akourki, A., Echegaray, A., & Mitjana, O. (2013). Seminal Characteristics in Spanish Purebred Stallions: A Retrospective. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 649-652. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/S0737080612007368/1-s2.0-S0737080612007368-main.pdf?\\_tid=12404fce-48c5-11e4-a266-00000aab0f6c&acdnat=1412097378\\_2c950cbde697ec770da432ac02876911](http://ac.els-cdn.com/S0737080612007368/1-s2.0-S0737080612007368-main.pdf?_tid=12404fce-48c5-11e4-a266-00000aab0f6c&acdnat=1412097378_2c950cbde697ec770da432ac02876911)
- Akourki, A., Echegaray, A., & Mitjana, O. (2013). Seminal Characteristics in Spanish Purebred Stallions: A Retrospective. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 649-652. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/S0737080612007368/1-s2.0-S0737080612007368-main.pdf?\\_tid=0b8813fe-49ad-11e4-ad49-00000aab0f6b&acdnat=1412197010\\_811cefb96365145bd79f42b57bb9ce2d](http://ac.els-cdn.com/S0737080612007368/1-s2.0-S0737080612007368-main.pdf?_tid=0b8813fe-49ad-11e4-ad49-00000aab0f6b&acdnat=1412197010_811cefb96365145bd79f42b57bb9ce2d)
- Almeida, F., Barros, L., Guerra, M., Silva, E., & Silva, S. (2013). Efeito da adição de glutatona peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, 65, 430-438.



- Alvarenga, M. (2003). Novos conceitos relacionados a congelação de semen de garanhões. *IV Seminario internacional de reproducción de grandes animales.*, 93-105.
- Alvarenga, M., & Papa, F. (2011). Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. *Spermova*, 1, 7-10.
- Alvarenga, M., Candeias, M., Nunes, H., Rios, A., Russo, M., Teoro do Carmo, M., . . . Zandonadi, F. (2012.). Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallions. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 41(9), 1989-1995.
- Alvarenga, M., Carmo, M., Gómez, G., Medeiros, A., & Papa, F. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*(58), 273-276.
- Alvarenga, M., Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., & Papa, F. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*.(58), 277-279.
- Alvarenga, M., Keith, S., Landim-Alvarenga, F., & Squires, E. (2000). Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of the XI International Congress on Animal Reproduction and AI*.
- Alvarenga, M., Landim- Alvarenga, F., & Papa, F. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen. *Animal Reproduction Science.*, 89, 105-113.
- Álvarez, C., Gil, L., & Lozano, D. (2011). Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanidad Militar.*, 67(3), 284-290.
- Alveranga, M., Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., & Papa, F. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 58, 277-279.
- Amann, R., & Graham, J. (1993). Spermatozoal function. *Equine Reproduction.*, 715-745.
- Amann, R., & Graham, J. (2011). Spermatozoal function. *Equine Reproduction.*, 1062-1064.
- Amann, R., & Pickett, B. (1987). Extension and storage stallion spermatozoa: a review. *Journal of Veterinary Science*, 7(5), 289-302.
- Amann, R., & Pickett, B. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, 145-173.
- Anderson, J. (2012). *Spermiostasis - The Accumulator Stallion*. Retrieved from Equine-Reproduction: <http://www.equine-reproduction.co.uk/articles/Spermiostasis.shtml>
- Araújo, A., Matos, D., Roberto, I., & Toniolli, R. (2008). Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.*, 32(4), 225-232.
- Argentinos, A. (2013). Equinos. *Agroalimentos Argentinos II*, 231-238. Retrieved from <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Introduccion%20a%20la%20produccion>

%20agropecuaria/Documentos/2009/Sitio%20argentino%20de%20produccion%20animal.%20Equinos.PDF

- Arnaud, G., Batellier, F., Duchamp, G., Fauquant, J., Magistrini, M., Vidament, M., & Yvon, J. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, *68*, 181-190.
- Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled- semen technology. *Animal Reproduction Science*, *107*, 268-275.
- Aurich, C., & Sperser, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled- stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, *67*, 912-918.
- Aurich, C., Aurich, J., Kankofer, M., Muller-Schlosser, F., & Pagl, R. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk- based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*, *66*, 1115-1122.
- Aurich, C., Kankofer, M., & Pagl, R. (2006). Antioxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. *Journal of Veterinary Medicine*, *53*, 486-489.
- Aurich, J., Hoppe, H., & Kühne, A. (1996). Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, *46*, 791-797.
- Aurich, J., Hoppe, H., & SchÖnherr, U. (1998). Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled- stored stallion semen. *Theriogenology*, *48*, 185-192.
- Balercia, G., Boscaro, M., Buldreghini, E., Mantero, F., Mazzanti, L., Moroni, C., . . . Vignini, A. (2006). The production of peroxynitrite by human spermatozoa may affect sperm motility through the formation of protein nitrotyrosine. *Fertil Steril*, *85*, 947-953.
- Ball, B. (2008). Oxidative stress osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, *107*, 260-267.
- Ball, B., Baumber, I., Gravance, C., & Medina, V. (2001). Effect of Antioxidants on preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa During Storage at 5 °C. *Theriogenology*, *56*, 577-589.
- Ball, B., Baumer, J., & Linfor, J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, *66*, 772-779.
- Ball, B., Crowe, J., Delfino, W., Kysar, P., Linfor, J., Meyers, A., . . . Tablin, F. (2006). Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, *74*(2), 359-365.
- Barreto, M., Fagundes, B., Ferreira, V., Maurício, F., Shimoya, A., & Silva, J. (2010). Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *39*(2), 273-278.

- Barros, P., Castro, F., Costa, R., Cunha, I., Do Vale Miquelito, L., Oberst, E., . . . Rodrigues, T. (2008). Criopreservação de espermatozóides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Ciência Rural.*, 38(7), 1972-1977.
- Bedfort, S., Cook, N., Jasko, D., Mumfort, E., Pickett, B., & Squires, E. (1993). Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology.*, 40, 885-893.
- Bell, M., Hellstrom, W., Sikka, S., & Wang, R. (1994.). Effect of sodium nitroprusside on sperm motility viability and lipid peroxidation. *Fertil Steril.*, 61, 1117-1122.
- Bevers, M., Colenbrander, B., Gadella, B., & Rathi, R. (2001). Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. *Biology of Reproduction.*, 65(2), 462-470. Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/full/10.1095/biolreprod65.2.462>
- Bischof, C., Devireddy, D., Olin, W., Roberts, P., Swanlund, T., Troedsson, J., & Vincente, M. (2002). Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry. *Biology of Reproduction*, 66(1), 222-231. Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1095/biolreprod66.1.222>
- Blanchard, T., Brinsko, S., Cochran, M., Love, C., Rigby, S., & Varner, D. (2001). Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science.*, 68, 171-180.
- Blanchard, T., Combes, G., Katila, T., & Vamera, D. (1997). Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology.*, 48, 1085-1092.
- Bonadonna, T. (1989). Reproducción animal e inseminación artificial. In T. Bonadonna, *Reproducción animal e inseminación artificial*. (Vol. I). Buenos Aires.
- Bonet, S., Briz, M., Caiza de la Cueva, F., Miró, J., Rigau, T., & Rodríguez, G. (1997). Subjecting horse spermatozoa to hyposmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology.*, 47, 765-784.
- Borgesa, G. (2004). *Evaluación de dos dilutores en dos métodos de congelamiento en semen de caballo peruano de paso*. Lima.
- Brass, K. (2001). Inseminación artificial en la especie equina. *Biotechnología de la reproducción*, 525-561.
- Brinsko, S., & Varner, D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1), 205-218.
- Brinsko, S., & Varner, D. (1992). Artificial Insemination and Preservation of Semen. Stallion Management Vet Clinics North America. *Equine Practice.*, 205-218.
- Brinsko, S., Crockett, E., & Squires, E. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage.

- Bustamante, I., Dutra, C., Gregory, R., Jobim, M., Mattos, R., Pederzoli, C., & Sgaravatti, A. (2009). Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 6(2), 392-399.
- Captain, H. (2002). *Veterinary Notes for Horse Owners*. Retrieved from <http://books.google.com.br/books?id=rcNw1sUPmDsC&pg=PA370&dq=horse+semen&hl=es&sa=X&ei=pBwzVM2wKtP7sATcnIGoAg&ved=0CCsQ6AEwAg#v=onepage&q=horse%20semen&f=false>
- Castelo, M., Ferreira, S., Linhares, Y., Martiliano, D., Mascarenhas, D., & Torres de Souza, J. (2014). Eficiência dos diluidores Cris e Botu-crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador. *Ciência Animal Brasileira*, 15(3), 322-329. Retrieved from <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/download/25327/17082>.
- CBRA, C. B. (2013). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen de animal*. (3 ed.). Belo Horizonte.
- Celeghini, E., Fernandes, C., Mattos, C., Oliveira, B., & Oliveira, G. (2013). Cryopreservation of equine semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(1), 23-28.
- Celeromics. (2013). *Celeromics*. Retrieved from <http://www.celeromics.com>
- Colenbrander, B., De Leeuw, F., De Leeuw, A., Den Daas, J., & Verkleij, A. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32-44.
- Costa, J., Fagundes, B., Pessanha Barreto, M., Straggiotti Silva, J., Valente de Souza, G., & Shimoya, A. (2008). Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(12), 2115-2119. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v37n12/06.pdf>
- Crabo, B., Hellander, J., & Samper, J. (1991). Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility and with glass wool/ Sephadex filters. *Journal of reproduction and fertility Supplement*, 44, 107-114.
- Crespilho, A. (2007). Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). São Paulo.
- Cunha, I., Quirino, C., Ribas, J., & Silva, J. (2007). Variação sazonal das características seminais em cavalos Pantaneiros. Belo Horizonte.
- Dacheux, F., Dacheux, J.-L., Fouchécourt, S., Locatelli, A., & Métayer, S. (2000). Stallion Epididymal Fluid Proteome: Qualitative and Quantitative Characterization; Secretion and Dynamic Changes of Major Proteins. *Biology of Reproduction*, 62,

- 1790–1803. Retrieved from  
<http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1095/biolreprod62.6.1790>
- Darin- Bennett, A., & White, I. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold- shock. *Cryobiology*, 466-470.
- Dickson, V. (2003). Technical considerations for cooltransported equine semen., (pp. 3-8). Pisa. Retrieved from  
<http://www.ivis.org/proceedings/SIVE/2003/lectures/varner2.pdf?LA=1>
- Dubey, R., Keller, P., & Roselli, M. (1998). Role of nitric oxide in the biology physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction*., 3-24.
- Equinest, T. (2010). *The Equinest*. Retrieved from  
<http://www.theequinest.com/breeds/pantaneiro/>
- Evans, G., Guerra, M., & Maxwell, W. (2004). Papel dos oxidantes e anti-oxidantes na Andrologia. *Revista brasileira de reprodução animal*., 28, 187-195.
- Fagali, N. (2001). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Departamento de Química.
- Fahy, G. (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1-13.
- Ganheim, A., Hearn, P., & Samper, J. (1994.). Pregnancy rates and effect of extender and motility and acrosome status of frozen thawed stallion spermatozoa. *Proceedings*., 40, 41-43.
- Giambérsio, A., & Lomeo, A. (1991). Water-Test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. *International Journal of Andrology*., 14(4), 278-282.
- Gojowsky, M., Henke, S., Idenhof, H., Rohn, K., Sieme, H., Wang, S., . . . Yu, C. (2013). Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. *Biology of Reproduction*, 88(3), 1-11. Retrieved from  
<http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1095/biolreprod.112.104661>
- Gomes, G., Jacob, J., & Medeiros, A. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*., 58, 277-279.
- González, A., & Ospitia, P. (2011). *Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática equina en caballos de la sabana de Bogotá*. Bogotá.
- González, L., Macías, B., Morillo, A., Ortega, C., Peña, F., Rodríguez, H., . . . Tapia, J. (2009). Effect of Cryopreservation on Nitric Oxide Production by Stallion Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1106-1111. Retrieved from  
<http://www.biolreprod.org/content/81/6/1106.full.pdf+html>

- Graham, J., & Loomis, P. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science.*, 119-128.
- Graham, J., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/ thawed semen. *Theriogenology.*, 64, 492-504.
- Hamilton Research, I. (2002). *Patent No. 4,350,816*. Estados Unidos.
- Hankins, K., & Samper, J. (2001). Breeding Mares with Frozen Semen in Private Practice. *AAEP Proceedings*, 314-318.
- Hellemann, C., & Lindemann, G. (1981). Congelación de semen equino en pellets y pajuelas. *Revista Oficial de la Asociación Nacional de Escuelas de Medicina Veterinaria*, 13(1), 30-33. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=C9LMRa3pao0C&pg=PA33&dq=horse+semen&hl=es&sa=X&ei=pBwzVM2wKtP7sATcnIGoAg&ved=0CEEQ6AEwBQ#v=onepage&q=horse%20semen&f=false>
- Hickman, R., Hoskins, D., & Stephens, D. (1988). Description, validation and performance characteristics of a new computer- automated sperm motility analysis system. *Biology of Reproduction.*, 48, 577-586.
- Hoffmann, N., Morandini, C., Oldenhof, H., Rohn, K., & Sieme, H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, 125, 112-118. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432011000716#>
- Holt, W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science.*, 62, 3-22.
- Householder, D., Pickett, B., & Voss, J. (1981). Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. *Journal Equine Veterinary Science*.(1), 9-13.
- Hundrieser, E., Kirchhoff, C., & Töpfer, P. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science.*, 58, 225-228.
- Kenney, R. (1983). Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. *Society for Theriogenology*.
- León, S., Moreno, D., Neira, J., & Ramírez, G. (2007). Efecto de la asociación L-glutamina - Etilenglicol en la Criopreservación de semen equino. *Revista de Medicina Veterinaria*(14), 93-105.
- Lodge, J., Salisbury, G., & Van Denmark, N. (1978). The Storage and planting. *Physiology of reproduction and IA of Cattle*, 2.
- Loomis, P. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science.*, 191-200.

- Mac Gann, L. (1978). Differing action of penetrating and non - penetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15, 382-390.
- Magistrini, M., Palmer, E., Trimeche, A., Vidament, M., & Yvon, J. (1999). Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 181-191.
- Mandina, M., & Rey, J. (2015). *El Caballo de Pura Raza Española*. Retrieved from University of Florida IFAS Extension: <http://edis.ifas.ufl.edu/an275>
- Medeiros, A. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, 89, 105-113.
- Melo, C., Papa, F., & Zahn, F. (2006). Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability? *Animal Reproduction Science*, 94, 64-66.
- Melo, M., Henry, M., & Snoeck, P. (2007). Effect of different freezing extenders on post-thaw equine spermatozoa viability. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 56-64.
- Minitube. (2010, 11). *EquiPro® - Preservation extender medium for fresh and cooled stallion semen*. Retrieved from Minitube: [http://www.biotay.com/upfiles/documento\\_archivo\\_42\\_1315542641.pdf](http://www.biotay.com/upfiles/documento_archivo_42_1315542641.pdf)
- Miró, J., Peña, A., & Taberner, E. (2006). Extracción y manipulación del semen. In J. Miró, A. Peña, & E. Taberner, *Servicio de Reproducción Equina* (Vol. 16, pp. 38-51). Barcelona.
- Miró, J., Quintero, A., Rigau, T., & Rodríguez, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, (59), 1973-1990.
- Monteiro, G., Reghini, M., & Uliani, R. (2010). Utilização da N-Acetilcisteína na conservação do sêmen equino à 5° C e 15 °C. *Conferência anual da associação brasileira dos veterinários de equídeos*, 11, 326-327.
- More, A. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215-218.
- Morilla de Mina, D. (1999). *Inseminación artificial equina*. Aberystwyth, Reino Unido: Instituto de estudios rurales.
- Morris, C., & Samper, J. (1998). Current methodology for Stallion semen cryopreservation: An international survey. *Theriogenology*, 49, 895-904.
- Nidacon. (2013, 03 01). *BotuCrio*. Retrieved from Nidacon Equine Products: [http://www.nidaconvet.com/uploads/1/7/8/9/17897677/botucrio\\_insert\\_tc04.pdf](http://www.nidaconvet.com/uploads/1/7/8/9/17897677/botucrio_insert_tc04.pdf)
- Nidacon. (2014). Retrieved from <http://nidacon.com/animal/botucrio/>

- Ocampo, D., Restrepo, G., & Velásquez, A. (2013). Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación científica.*, 16(2), 445-450.
- Oliveira, R., Rubins, M., & Silva, C. (2013). Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões da raça crioula usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotectores. *Ciência Animal Brasileira.*, 14(4), 488-494.
- Orozco, V., Rodríguez, H., Rosemberg, M., Santiani, A., & Tomatis, M. (2011). Evaluación de dos dilutores para la criopreservación de semen de caballo peruano de paso y sus efectos sobre la motilidad espermática e integridad funcional de membrana. *Científica*, 8(3), 209-216. Retrieved from [http://cientifica.edu.pe/\\_data/archivos/Investigaciones/Evaluaci%C3%B3n\\_de\\_dos\\_dilutores\\_para\\_la\\_criopreservaci%C3%B3n\\_de\\_semen\\_de\\_caballo\\_peruano\\_de\\_paso\\_y\\_sus\\_efectos\\_sobre\\_la\\_motilidad\\_espermatocica\\_e\\_integridad\\_funcional\\_de\\_membrana.pdf](http://cientifica.edu.pe/_data/archivos/Investigaciones/Evaluaci%C3%B3n_de_dos_dilutores_para_la_criopreservaci%C3%B3n_de_semen_de_caballo_peruano_de_paso_y_sus_efectos_sobre_la_motilidad_espermatocica_e_integridad_funcional_de_membrana.pdf)
- Palma, G. (2001). Biotecnología de la reproducción. *Argentina*, 95-114.
- Palmer, E. (1984). Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proceedings.*, 377-378.
- Papa, F. (2002). Utilización del dilutor MP50 para la criopreservación de semen equino. *Revista Brasileira de Reproducción Animal.*(26), 184-187.
- Pickett, B. (1992). Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. *Equine Reproduction.*, 705-715.
- Polge, C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 147, 498-508. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/pdfplus/10.2307/83164.pdf?acceptTC=true>
- Pons-Rejraji, H., Saez, F., & Sion, B. (2009). Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. *Gynecologie Obstetrique & Fertilité.*, 28, 203-213.
- Pycock, J. (2008). Management of the breeding stallion. *International Veterinary Information Service*, 216-222.
- Pycock, J. (2012). Stallion and semen evaluation. *Proceedings of the 51st British Equine Veterinary Association Congress BEVA*, (pp. 206-207). Birmingham. Retrieved from <http://www.ivis.org/proceedings/beva/2012/116.pdf>
- Quinn, P. (1985). A lipid- phase separation model of low- temperature damage to biological membranes. *Cryobiology.*, 22, 128-146.
- S.A.S, L. Z. (2013). *Laboratorios ZOO*. Retrieved from <http://www.laboratorioszoo.com/index.php/productos/animales-de-compania/tranquilizantes/85-tranquilanr-inyectable>
- Samper, J. (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Saunders.



- Samper, J. (2011). Breeding with cooled transported semen. In A. Mckinnon, & J. Voss, *Equine Reproduction* (2 da ed., p. 1317).
- Santos, F. (2014). Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado. 1-36.
- Sieme, H. (2009). Semen Evaluation. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination.*, 2ed, 59.
- Skaife, J. (2011). Evaluation of Semen. *Equine Reproduction*, 2ed, 1287.
- Valladares , P. (2007). *Costeo y determinación del precio de formar un caballo tres sangres finca "Las Acacias"*. Quito: Escuela Politécnica del Ejército.
- Varner, D. (2007). From a Sperm's Eye View- Revisiting Our Perception of This Intriguing cell. *Proceedings*, 53, 104-177.
- Vásquez, F. (2005). *Motilidad espermática post congelamiento en semen de caballo peruano de paso, usando tres dilutores comerciales*. Lima.
- Vidament, M. (2001). Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, 61, 201-218.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science.*, 60-61. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/12474590\\_The\\_causes\\_of\\_reduced\\_fertility\\_with\\_cryopreserved\\_semen](http://www.researchgate.net/publication/12474590_The_causes_of_reduced_fertility_with_cryopreserved_semen)
- Whittingham, D. (1971). Culture of mouse ova. *Reproduction et fertilité.*, 14, 7-21.

## 12. Tablas

**Tabla 1. Datos de los sementales**

| <b>SEMENTALES</b>                                |                   |                       |                            |                    |
|--|-------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------|
| <b>Nombre</b>                                    | <b>Lendario</b>   | <b>Destinado</b>      | <b>IN Julios</b>           | <b>Trincherazo</b> |
| <b>Edad (años)</b>                               | 9                 | 10                    | 5                          | 7                  |
| <b>Color</b>                                     | Tordo             | Tordo                 | Alazán tostado             | Alazán tostado     |
| <b>Alimentación</b>                              | Pasto             | Pasto y balanceado    | Pasto y balanceado         | Pasto              |
| <b>Medicamentos actuales</b>                     | Ninguno           | Ninguno               | Ninguno                    | Ninguno            |
| <b>Peso aproximado (Kg)</b>                      | 400               | 500                   | 500                        | 450                |
| <b>Ubicación (Parroquia)</b>                     | El Chaupi         | Cotogchoa             | Cangagua                   | Mulalo             |
| <b>Lugar de mantenimiento (Potrero- Establo)</b> | Potrero- pastoreo | Potrero- pesebrera    | Mixto (Potrero- pesebrera) | Potrero            |
| <b>Actividad que realiza</b>                     | Alta escuela      | Caballo de exhibición | Evaluación de morfología   | Rejoneo            |
| <b>Montas naturales</b>                          | 6                 | 4                     | 2                          | 6                  |
| <b>Gestaciones exitosas</b>                      | 3                 | 3                     | 2                          | 2                  |
| <b>Colectas con vagina artificial</b>            | 1                 | 1                     | 1                          | 1                  |

**Tabla 2. Características Macroscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación**

| Características Macroscópicas Previas de los eyaculados de los sementales previas a la criopreservación |             |         |                   |              |                              |                          |      |                |                   |
|---|-------------|---------|-------------------|--------------|------------------------------|--------------------------|------|----------------|-------------------|
| Nombre del semental   | Edad (Años) | Muestra | Color             | Volumen (ml) | Presencia/ausencia de sangre | Presencia/ausencia orina | pH   | Olor           | Consistencia      |
| Destinado   | 10          | 1       | Blanquecino opaco | 25           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.6  | Característico | Líquida /Cremosa  |
|   |             | 2       | Blanquecino opaco | 20           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.6  | Característico |                   |
| <b>Promedio</b>   |             |         |                   | 22.5         |                              |                          | 7.6  |                |                   |
| Legendario  | 10          | 1       | Blanquecino opaco | 20           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.1  | Característico | Líquida /Cremosa  |
|   |             | 2       | Blanquecino opaco | 17           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.1  | Característico |                   |
| <b>Promedio</b>   |             |         |                   | 18.5         |                              |                          | 7.1  |                |                   |
| <b>Promedio caballos 10 años</b>  |             |         |                   | 20.5         |                              |                          | 7.35 |                |                   |
| IN Julius   | 6           | 1       | Blanquecino opaco | 30           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.2  | Suigeneris     | Líquida /Cremosa  |
|   |             | 2       | Blanquecino opaco | 25           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.2  | Suigeneris     |                   |
| <b>Promedio</b>   |             |         |                   | 27.5         |                              |                          | 7.2  |                |                   |
| Trincherazo   | 6           | 1       | Blanquecino opaco | 40           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.4  | Inodoro        | Altamente viscosa |
|   |             | 2       | Blanquecino opaco | 30           | Ausencia                     | Ausencia                 | 7.4  | Inodoro        |                   |
| <b>Promedio</b>   |             |         |                   | 35           |                              |                          | 7.4  |                |                   |
| <b>Promedio caballos 6 años</b>   |             |         |                   | 31.25        |                              |                          | 7.3  |                |                   |
| <b>Promedio total</b>   |             |         |                   | 25.875       |                              |                          | 7.3  |                |                   |

**Tabla 3. ANOVA de una vía de las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, previas a la criopreservación**

| <b>Características de los eyaculados previo a la criopreservación</b> | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| <b>Volumen</b>  | 5.09           | 6.59                  | 0.075          |
| <b>Concentración</b>  | 50.00          | 6.59                  | 0.001          |
| <b>Motilidad</b>  | 6.67           | 6.59                  | 0.049          |
| <b>Espermatozoides vivos (%)</b>                                      | 6.67           | 6.59                  | 0.049          |
| <b>Alteraciones morfológicas espermáticas (%)</b>                     | 14.93          | 6.59                  | 0.012          |

**Tabla 4. Características Microscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la criopreservación**

| Características Microscópicas de los Eyaculados Previas a la Criopreservación |      |         |                     |  |                           |                             |                               |
|---|------|---------|---------------------|--|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Nombre del semental   | Edad | Muestra | Motilidad total (%) | Concentración (Espermatozoides x10 <sup>6</sup> /mL) | Espermatozoides Vivos (%) | Espermatozoides Muertos (%) | Alteraciones Morfológicas (%) |
| Destinado   | 10   | 1       | 70                  | 200  | 65.0                      | 35.0                        | 11                            |
|   |      | 2       | 65                  | 180  | 60.0                      | 40.0                        | 12                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 67.5                | 190  | 62.5                      | 37.5                        | 11.5                          |
| Legendario  | 10   | 1       | 60                  | 120  | 55.0                      | 45.0                        | 14                            |
|   |      | 2       | 55                  | 110  | 60.0                      | 40.0                        | 17                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 57.5                | 115  | 57.5                      | 42.5                        | 15.5                          |
| <b>Promedio caballos 10 años</b>  |      |         | 62.5                | 152.5  | 60.0                      | 40.0                        | 13.5                          |
| IN Julius   | 6    | 1       | 75                  | 360  | 70.0                      | 30.0                        | 7                             |
|   |      | 2       | 70                  | 320  | 65.0                      | 35.0                        | 4                             |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 72.5                | 340  | 67.5                      | 32.5                        | 5.5                           |
| Trincherazo   | 6    | 1       | 65                  | 280  | 55.0                      | 45.0                        | 9                             |
|   |      | 2       | 60                  | 250  | 50.0                      | 50.0                        | 9                             |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 62.5                | 265  | 52.5                      | 47.5                        | 9                             |
| <b>Promedio caballos 6 años</b>   |      |         | 67.5                | 302.5  | 60.0                      | 40.0                        | 7.25                          |
| <b>Promedio Total</b>   |      |         | 65                  | 227.5  | 60                        | 40                          | 10.38                         |

**Tabla 5. Características Microscópicas de los Eyaculados Luego de la Criopreservación con BotuCrio®**

| Características Microscópicas Luego de la Criopreservación- BotuCrio® |      |         |                     |   |                           |                             |                               |
|---|------|---------|---------------------|---|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Nombre del semental   | Edad | Muestra | Motilidad total (%) | Concentración (Espermatozoides x106/mL) | Espermatozoides Vivos (%) | Espermatozoides Muertos (%) | Alteraciones Morfológicas (%) |
| Destinado   | 10   | 1       | 62                  | 40                                      | 46.0                      | 54.0                        | 26                            |
|   |      | 2       | 58                  | 40                                      | 45                        | 55                          | 23                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 60                  | 40                                      | 45.5                      | 54.5                        | 24.5                          |
| Legendario  | 10   | 1       | 25                  | 40                                      | 25.0                      | 75.0                        | 26                            |
|   |      | 2       | 20                  | 40                                      | 20.0                      | 80.0                        | 31                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 22.5                | 40                                      | 22.5                      | 77.5                        | 28.5                          |
| <b>Promedio caballos 10 años</b>                                      |      |         | 41.25               | 40                                      | 34                        | 66                          | 26.5                          |
| IN Julius   | 6    | 1       | 65                  | 40                                      | 60.0                      | 40.0                        | 14                            |
|   |      | 2       | 60                  | 40                                      | 55.0                      | 45.0                        | 19                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 62.5                | 40                                      | 57.5                      | 42.5                        | 16.5                          |
| Trincherazo   | 6    | 1       | 50                  | 40                                      | 30.0                      | 70.0                        | 18                            |
|   |      | 2       | 45                  | 40                                      | 35                        | 65                          | 25                            |
| <b>Promedio</b>   |      |         | 47.5                | 40                                      | 32.5                      | 67.5                        | 21.5                          |
| <b>Promedio caballos 6 años</b>                                       |      |         | 55                  | 40                                      | 45                        | 55                          | 19                            |
| <b>Promedio total</b>   |      |         | 48.13               | 40                                      | 39.5                      | 60.5                        | 22.75                         |

**Tabla 6. ANOVA de una vía de las características Microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, luego de la criopreservación con BotuCrio®**

| <b>Características Luego de usar BotuCrio®</b>    | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| <b>Motilidad</b>                                  | 58.88          | 6.59                  | 0.001          |
| <b>Espermatozoides vivos (%)</b>                  | 48.98          | 6.59                  | 0.001          |
| <b>Alteraciones morfológicas espermáticas (%)</b> | 3.79           | 6.59                  | 0.115          |

**Tabla 7. Características Microscópicas de los Eyaculados Luego de la Criopreservación con EquiPRO® CryoGuard™**

| <b>Características Microscópicas Luego de la crio preservación EquiPRO® CryoGuard™</b> |             |                |                            |  |                                  |                                    |                                      |
|--|-------------|----------------|----------------------------|--|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Nombre del semental</b>   | <b>Edad</b> | <b>Muestra</b> | <b>Motilidad total (%)</b> | <b>Concentración (Espermatozoides x106/mL)</b> | <b>Espermatozoides Vivos (%)</b> | <b>Espermatozoides Muertos (%)</b> | <b>Alteraciones Morfológicas (%)</b> |
| <b>Destinado</b>   | 10          | <b>1</b>       | 20                         | 40   | 15.0                             | 85.0                               | 45                                   |
|  |             | <b>2</b>       | 15                         | 40   | 15.0                             | 85.0                               | 38                                   |
| <b>Promedio</b>  |             |                | 17.5                       | 40   | 15.0                             | 85.0                               | 41.5                                 |
| <b>Legendario</b>  | 10          | <b>1</b>       | 10                         | 40   | 10.0                             | 90.0                               | 56                                   |
|  |             | <b>2</b>       | 12                         | 40   | 7                                | 93                                 | 60                                   |
| <b>Promedio</b>  |             |                | 11                         | 40   | 8.5                              | 91.5                               | 58                                   |
| <b>Promedio caballos 10 años</b>   |             |                | 14.25                      | 40   | 11.75                            | 88.25                              | 49.75                                |
| <b>IN Julius</b>   | 6           | <b>1</b>       | 45                         | 40   | 30.0                             | 70.0                               | 34                                   |
|  |             | <b>2</b>       | 40                         | 40   | 25                               | 75                                 | 39                                   |
| <b>Promedio</b>  |             |                | 42.5                       | 40   | 27.5                             | 72.5                               | 36.5                                 |
| <b>Trincherazo</b>   | 6           | <b>1</b>       | 25                         | 40   | 15.0                             | 85.0                               | 44                                   |
|  |             | <b>2</b>       | 20                         | 40   | 10                               | 90                                 | 46                                   |
| <b>Promedio</b>  |             |                | 22.5                       | 40   | 12.5                             | 87.5                               | 45                                   |
| <b>Promedio caballos 6 años</b>  |             |                | 32.5                       | 40   | 20                               | 80                                 | 40.75                                |
| <b>Promedio total</b>  |             |                | 23.38                      | 40   | 15.88                            | 84.13                              | 45.25                                |



**Tabla 8. ANOVA de una vía de las características Microscópicas de los eyaculados de los cuatro sementales, luego de la criopreservación con EquiPro®CryoGuard™**

| <b>Características Luego de usar EquiPro®CryoGuard™</b> | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| <b>Motilidad</b>  | 37.41          | 6.59                  | 0.002          |
| <b>Espermatozoides vivos (%)</b>                        | 18.23          | 6.59                  | 0.009          |
| <b>Alteraciones morfológicas espermáticas (%)</b>       | 3.79           | 6.59                  | 0.115          |

**Tabla 9. ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas de las muestras de los cuatro sementales luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™**

| <b>ANOVA con arreglo factorial de las características microscópicas de las muestras de los cuatro sementales luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™</b> |                |                       |                |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| <b>Motilidad</b>  |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Caballo</b>  | 81.71          | 4.066                 | 0.000          |
| <b>Diluyente</b>  | 230.61         | 5.318                 | 0.000          |
| <b>Interacción</b>  | 16.10          | 4.066                 | 0.001          |
| <b>Espermatozoides vivos (%)</b>  |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Caballo</b>  | 63.43          | 4.066                 | 0.000          |
| <b>Diluyente</b>  | 264.60         | 5.318                 | 0.000          |
| <b>Interacción</b>  | 7.65           | 4.066                 | 0.001          |
| <b>Alteraciones morfológicas espermáticas (%)</b>   |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Caballo</b>  | 15.14          | 4.066                 | 0.001          |
| <b>Diluyente</b>  | 160.40         | 5.318                 | 0.000          |
| <b>Interacción</b>  | 2.28           | 4.066                 | 0.156          |

**Tabla 10. ANOVA de las características microscópicas de las muestras, de los cuatro sementales separados por edades, luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™**

| <b>ANOVA con arreglo factorial. de las características microscópicas de las muestras, de los cuatro sementales separados por edades, luego de la criopreservación con los diluyentes BotuCrio® y EquiPro®CryoGuard™</b> |                |                       |                |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| <b>Motilidad por edades</b>   |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Edades</b>   | 5.69           | 4.747                 | 0.034          |
| <b>Diluyente</b>  | 13.62          | 4.747                 | 0.003          |
| <b>Interacción</b>  | 0.11           | 4.747                 | 0.743          |
| <b>Espermatozoides vivos (%) por edades</b>   |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Edades</b>   | 2.99           | 4.747                 | 0.110          |
| <b>Diluyente</b>  | 18.00          | 4.747                 | 0.001          |
| <b>Interacción</b>  | 0.06           | 4.747                 | 0.809          |
| <b>Alteraciones morfológicas espermáticas (%)</b>   |                |                       |                |
|   | <b>Valor F</b> | <b>F Crítico (Fc)</b> | <b>Valor P</b> |
| <b>Edades</b>   | 6.72           | 4.747                 | 0.024          |
| <b>Diluyente</b>  | 49.95          | 4.747                 | 0.000          |
| <b>Interacción</b>  | 0.06           | 4.747                 | 0.818          |

**Tabla 11. Comparación de la variación de los resultados de las características microscópicas previas y después de la criopreservación**

| <b>Características microscópicas</b>                      | <b>Motilidad total (%)</b> | <b>Espermatozoides Vivos (%)</b> | <b>Espermatozoides Muertos (%)</b> | <b>Alteraciones Morfológicas (%)</b> |
|---|----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Previas a la criopreservación</b>                      | 65                         | 60                               | 40                                 | 10.38                                |
| <b>Luego de la Criopreservación- BotuCrio®</b>            | 48.13                      | 39.5                             | 60.5                               | 22.75                                |
| <b>Luego de la crio preservación- EquiPRO® CryoGuard™</b> | 23.38                      | 15.88                            | 84.125                             | 45.25                                |

## 13. ANEXOS

### Anexo 1. Valores normales para los parámetros seminales según varios autores

| Valores Seminales                                 | Autores             |                      |           |                    |
|---|---------------------|----------------------|-----------|--------------------|
|   | Pickett y col. 1975 | Dowset y Pattie 1982 | Klug 1982 | Mattos y col. 1989 |
| Volumen total (ml)                                | 66                  | 63.6                 | -         | -                  |
| Volumen sin gel (ml)                              | 52                  | 45.3                 | 75.6      | 60                 |
| Volumen de gel (ml)                               | 7                   | 16.8                 | -         | -                  |
| Concentración ( $10^6$ /ml)                       | 281                 | 178                  | 304.5     | 250                |
| Nº total espermatozoides                          | 15                  | 7.2                  | 21.6      | 12                 |
| Motilidad total (%)                               | 73                  | 72.1                 | 63.1      | 50                 |
| Motilidad progresiva (%)                          | -                   | -                    | 35.6      | 25                 |
| Espermatozoides vivos (%)                         | -                   | -                    | 69.5      | 75                 |
| Espermatozoides sin alteraciones morfológicas (%) | -                   | -                    | 55.6      | 50                 |

**Fuente:** (González & Ospitia, 2011)

## Anexo 2. Ficha técnica del diluyente BotuCrio®

# BotuCrio®

### Intended Use: summary and explanation

**BotuCrio®** is a freezing extender optimized for freezing of equine sperm. It is suitable for both fresh as well as for **EquiPure™** treated sperm.

### Components

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| Egg yolk              | Gentamidn (0.5 g/l) |
| Carbo hydrates        | Excipients          |
| Amino acids           | Cryo protectants    |
| Preservatives         | Ultra Pure Water    |
| Penidilin K (1.0 g/l) |                     |

Bottles and screw corks are M.E.A. tested

### Storage and Stability

The temperature of the product should be below +10° C upon arrival. If not to be used immediately, store at -20°C. After opening, store at 2-8° C for up to 3 days.

### Precautions and Warnings

- Do not use any solution which shows evidence of bacterial contamination or if screw cork accidentally comes in contact with unsterile surfaces
- Do not use contents if tamper-evident seal is broken

### Ordering Information

| Description  | Volume   | Article No. |
|--------------|----------|-------------|
| BotuCrio®    | 25mL*    | BTC-025     |
| BotuSemen®   | 400mL    | BTS-400     |
| SpermFilter® | 1 pcs    | BTF-001     |
| EquiPure™    | 2 x 20mL | EPB-040     |
| EquiPure™    | 100mL    | EPB-100     |

\*minimum order 4 x 25mL

### Procedures for using BotuCrio®

#### Freezing EquiPure™ treated sperm

1. Process the sperm according to the instructions for **EquiPure™**
2. Transfer the pellet to a new tube containing **BotuCrio®**
3. Continue from instruction no. 3 below. Be careful not to dilute the sperm pellet too much. The ratio should be 1/3 sperm pellet and 2/3 **BotuCrio®**

#### Freezing untreated sperm

1. Dilute raw semen 1:1 with **BotuSemen®** (room temperature)
2. Concentrate sperm
  - a. by using BotuPharma **SpermFilter®** or;
  - b. by using a cushion-Centrifugation for 10 minutes (room temperature) at 500 x g and then remove the supernatant
3. Resuspend (room temperature) with sufficient amount of **BotuCrio®** to achieve the number of straws to be frozen. (The final concentration should be 200-400 million per ml depending on the number of straws, usually 4-6 per dose. The total number of sperm per dose should be 250 million motile and normal sperm after thawing)
4. Load the 0.5 ml straws (room temperature)
5. Place the straws directly at 4-6°C for 20-30 minutes (refrigerator)
6. Freeze in Nitrogen vapor (3-6 cm above the surface) for 15-20 minutes or if machine is used: 20-40°C per minute until minus 120°C
7. Plunge in Liquid Nitrogen
8. Thaw at 46°C for 20 seconds for optimum results (or 37°C for 1 minute), using a water bath
9. Check survival 10 minutes after thawing



[www.nidacon.com](http://www.nidacon.com)

Manufacturer:  
Nidacon, Råjelbergsgatan 16 B, SE-431 37 Mölndal, Sweden  
Tel: +46-31-703 06 30, Fax: +46-31-40 54 15  
E-mail: [contact@nidacon.com](mailto:contact@nidacon.com), [www.nidacon.com](http://www.nidacon.com)


For further technical information or assistance, please contact your distributor or the manufacturer.

**Nidacon**

INS-BTC02/04

## Anexo 3. Ficha técnica del diluyente EquiPRO® CryoGuard™

Fuente: (Minitube, 2010)



# TECHNICAL REPORT

10 | 2009

### EQUIPRO® CRYOGUARD™: MINITUBE DESARROLLA UNA NUEVA LINEA DE DILUYENTES PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO

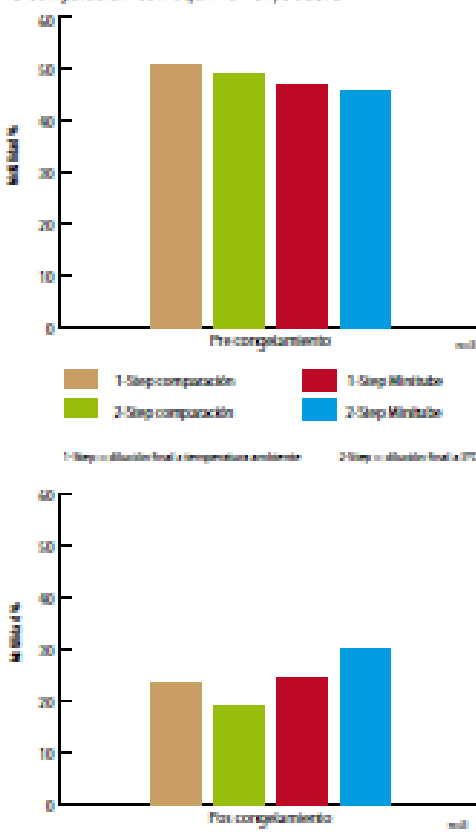
Los protocolos existentes para la crioconservación de semen equino y los resultados obtenidos en la práctica se caracterizan por su variabilidad. Entre sementales, entre eyaculados de un mismo individuo y entre laboratorios, suelen haber grandes diferencias, lo que hace necesario disponer de una gama de medios que se adapte de la mejor forma posible a cada caso.

Los trabajos científicos de los últimos años, y la experiencia práctica en los laboratorios donde se produce un gran número de dosis de semen congelado equino sugieren modificar los protocolos originales. Entre otras, destacar:

1. reducir la cantidad de yema de huevo en el medio, sin prescindir totalmente de ella.
2. trabajar con porcentajes de glicerina mas bajos y/o variables de acuerdo a la experiencia previa con determinados sementales.
3. finalmente, se esta trabajando en algunos laboratorios con curvas de enfriamiento lento del semen a 5°C, agregando la fracción del medio que contiene la Glicerina tambien a 5°C y realizando el envasado a dicha temperatura, con buenos resultados.


En cooperación con la Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, Minitube ha realizado una serie de estudios, incluido el uso de diferentes amidas en combinación con niveles reducidos de glicerina. En este caso los resultados fueron muy variables y en promedio inferiores comparados con los obtenidos utilizando medios que no contenían amidas, y además con niveles bajos de yema de huevo y Glicerina. Minitube se encuentra en la última etapa de desarrollo de una serie de nuevos medios para la congelación de semen equino. Hasta la fecha, y a la espera de los datos de parición de las yeguas, los resultados son incuestionables.

**Figura. Motilidad progresiva del semen antes y después de la congelación con EquiPro® CryoGuard™**



| Condición          | Pre congelamiento (%) | Post (%) |
|--------------------|-----------------------|----------|
| 1-Step comparación | ~50                   | ~25      |
| 2-Step comparación | ~48                   | ~20      |
| 1-Step Minitube    | ~45                   | ~25      |
| 2-Step Minitube    | ~45                   | ~30      |

1-Step = dilución final a temperatura ambiente    2-Step = dilución final a 5°C



www.minitube.de    Our knowledge - Your success    minitube @ minitube.de