



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino”

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

Autoras:

Gabriela Micaela Peláez Zhingri

C.I.: 0105500599

gabrielapc96@hotmail.com

María Paula Palacios Aguilar

C.I.: 0104793146

paupaupalacios@hotmail.com

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero. Ph.D., Mgs., M.V.Z

C.I.: 0103912846

Cuenca, Ecuador

20 - octubre - 2021



RESUMEN.

La *L-carnitina* (LC) juega un papel clave en el metabolismo de los espermatozoides basado en la producción de energía (oxidación- β) y la reducción de la disponibilidad de lípidos para la peroxidación. En este sentido, esta investigación evaluó el efecto de la LC suplementada a dos diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballo peruano de paso, tanto refrigerados, como congelados–descongelados. Un primer experimento evaluó la dosis más idónea de LC (1, 5, 10, 25 y 50 mM) suplementado a los diluyentes INRA-96® y UHT (más 6% yema de huevo) en 9 eyaculados individuales, ya sea fresco o refrigerados durante 96 h. Un segundo experimento evaluó el efecto de LC suplementada a los diluyentes INRA-96 y UHT, o INRA-Freeze® y UHT (más 5% glicerol) en 16 eyaculados de semen agrupados (n= 8 agrupaciones, 2 eyaculados/grupación) ya sea refrigerados o congelados, respectivamente. Los resultados demostraron que 25 mM de LC preservaron mejor la cinética espermática e integridad de las membranas plasmática y acrosomal en muestras individuales refrigeradas durante 48 y 96 h. En muestras agrupadas, diluidas con INRA (96 o Freeze) y suplementadas con LC mantuvieron mejor las características espermáticas que el diluyente UHT durante 72 h de refrigeración. Después del proceso de congelación–descongelación, la suplementación de LC al diluyente INRA-Freeze mejoró la motilidad e integridad de la membrana plasmática, mientras que la adición a UHT mejoró la integridad de la membrana acrosomal. Se concluye que la adición de *L-carnitina* a los diluyentes a base leche desnatada tiene un efecto positivo sobre la cinética e integridad de membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos refrigerados y congelados.

Palabras claves: L-carnitina. Semen equino. Refrigeración. Congelación. Criosupervivencia espermática.



ABSTRACT.

L-carnitine (LC) plays a key role in sperm metabolism based on energy production (β -oxidation) and reduction of lipid availability for peroxidation. In this sense, this research evaluated the effect of LC supplemented to two skimmed milk-based extenders on cryosurvival of chilled and frozen-thawed Peruvian Paso horse spermatozoa. A first experiment assessed the optimal LC dose (1, 5, 10, 25 and 50 mM) added to INRA-96®- and UHT-extendors (plus 6% egg yolk) in 9 individual fresh and chilled for 96 h semen ejaculates. A second experiment evaluated the effect of LC added to extendors: INRA-96 or UHT, and INRA-Freeze® or UHT (plus 5% glycerol), in 16 ejaculates pooled (n=8 pools, 2 ejaculates/pool) either chilled or frozen, respectively. The results demonstrated that 25 mM LC, successfully preserved the kinetics and integrity of plasma and acrosomal membranes in individual samples of cold-stored equine semen for 48 and 96 h. In pooled samples, diluted with INRA (96 or Freeze) and supplemented with LC, the sperm characteristics were better maintained than UHT-extender up to 72 h of cold storage. After the freezing-thawed process, LC supplementation to INRA-Freeze extender improved motility and plasma membrane integrity, while the addition to UHT-extender improved acrosomal membrane integrity. In conclusion, the addition of L-carnitine to skimmed milk-based extendors has a positive effect on the kinetics and integrity of plasma and acrosomal membranes of chilled and frozen-thawed equine sperm.

Keywords: L-carnitine. Equine semen. Chilled. Freezing. Sperm cryosurvival.



ÍNDICE DEL TRABAJO.

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.	2
ÍNDICE DEL TRABAJO.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE ANEXOS.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	14
DEDICATORIA.....	15
ACRÓNIMOS.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. REVISION DE LITERATURA.....	22
3.1 Características del espermatozoide.....	22
3.2. Estructura del espermatozoide.....	22
3.2.1. Cabeza.....	22
3.2.3. Cuello.....	23
3.2.3 Acrosoma.....	24
3.2.4. Cola espermática.....	24
3.2.6. Membrana del espermatozoide.....	24
3.3. Fisiología espermática.....	25
3.3.1 Maduración.....	25
3.3.2 Capacitación.....	27
3.3.3 Reacción acrosomal.....	27
3.4 Obtención de espermatozoides equinos.....	29
3.4.1 Recolección y evaluación de semen.....	29
3.4.2 Criopreservación.....	29
3.5 Crioprotectores.....	31
3.5.1 Agentes penetrantes.....	31
3.5.2 Agentes no penetrantes.....	31
3.6 Concentración espermática.....	32



3.7 Motilidad Espermática.....	32
3.8 Análisis Espermático Asistido por Ordenador (CASA).....	33
3.8.1 Motilidad espermática.....	33
3.9 Mecanismos de crio lesión en el semen equino.....	34
3.9.1. Estrés osmótico.....	34
3.9.2 Estrés Térmico.....	35
3.9.3. Estrés oxidativo.....	35
3.9.4. Apoptosis.....	35
3.10 Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen equino....	36
3.10.1 Catalasa.....	37
3.10.2 Superóxido dismutasa.....	37
3.10.3 Vitamina E.....	37
3.10.4 Glutatión.....	38
3.10.5 Melatonina.....	39
3.10.6 Betahidroxitolueno.....	39
3.11. <i>L-carnitina</i>	40
3.11.1 Estructura química de la <i>L-carnitina</i>	40
3.11.2 Función Metabólica.....	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.1. Materiales.....	43
4.1.1 Materiales físicos.....	43
4.1.2 Materiales biológicos.....	44
4.1.3 Materiales Químicos.....	44
4.1.4 Materiales de laboratorio.....	44
4.1.5 Reactivos.....	45
4.2 Metodología.....	46
4.2.1 Área de estudio.....	46
4.2.2 Elaboración de diluyentes y medios.....	46
4.2.3 Diseño experimental.....	49
4.3 Metodología para la investigación.....	50
4.3.1 Reproductores y recolección de semen.....	50
4.3.2 Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de <i>L-carnitina</i>	51
4.3.3 Experimento 2. Efecto de la <i>L-carnitina</i> en semen equino criopreservado.....	52
4.3.3.1 Refrigeración del semen.....	53
4.3.3.2 Congelación del semen.....	54
4.4 Análisis de calidad espermática.....	55



4.4.1 Cinética espermática	55
4.4.2 Integridad de membranas espermáticas	56
4.5. Análisis estadísticos	57
5. RESULTADOS	58
5.1. Análisis de determinación de concentración óptima de <i>L-carnitina</i> (Obj. 1)...	58
5.1.1. Análisis de los parámetros cinéticos.....	58
5.1.2. Análisis de la integridad de las membranas espermáticas	66
5.2. Efecto de la LC en semen equino criopreservado (Obj. 2).....	68
5.2.1. Efecto de la <i>L-carnitina</i> en esperma refrigerado.....	68
5.2.2. Efecto de la L-carnitina en esperma congelado – descongelado	75
6. DISCUSION.....	85
7.CONCLUSIONES	92
8. RECOMENDACIONES.....	93
9. REFERENCIAS	94
10. ANEXOS.....	104



INDICE DE FIGURAS.

Fig 1. Cabeza del espermatozoide.....	23
Fig 2. Formula estructural de la L-carnitina (Hoppel, 2003)	40
Fig 3. Biosíntesis endógena de la carnitina (Hoppel, 2003)	41
Fig 4. Ubicación del área de estudio (Azuay).....	46
Fig 5. Diseño Experimental	50
Fig 6. Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides (Montoya, 2009)	52
Fig 7. Motilidad total (MT) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de L-carnitina, y refrigeradas durante 48 y 96 h.....	59
Fig 8. Motilidad progresiva (MP %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h.....	60
Fig 9. Velocidad Curvilínea. (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h..	61
Fig 10. Velocidad rectilínea. (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h..	62
Fig 11. Rectitud (STR, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h..	63
Fig 12. Linealidad (LIN, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h.	64
Fig 13. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) de muestras espermáticas de caballo diluidas en INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h..	65
Fig 14. Frecuencia de batida del flagelo (BCF, μm) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h.	66
Fig 15. Espermatozoides con membrana plasmática íntegra y acrosoma íntegro simultáneo (IPIA, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h.....	67
Fig 16. Integridad de membrana plasmática o viabilidad (IMP, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h.....	67



Fig 17. Integridad de membrana acrosomal (IMA, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. 68

Fig 18. Motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h..... 70

Fig 19. Velocidades curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. 71

Fig 20. Parámetros de relación, STR (%), LIN (%) y WOB (%) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. 72

Fig 21. ALH y BCF de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. 73

Fig 22. Subcategorías de fluorescencia de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h..... 74

Fig 23. Integridad de membrana plasmática (IMP) y acrosomal (IMA) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. 75

Fig 24. Evolución temporal de la temperatura medida en el interior de las pajuelas (T_{in}) en el protocolo de congelación de dos rampas de congelamiento mantenida dentro de un cryo-box y vapores de NL_2 estático. 76

Fig 25. Motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %) de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 78

Fig 26. VCL, VAP y VSL de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 79

Fig 27. STR, LIN y WOB de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 80

Fig 28. ALH y BCF de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 81

Fig 29. Subcategorías de fluorescencia de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 83

Fig 30. IMP e IMA de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co..... 84



INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Diluyente UHT-R (para refrigeración).....	47
Tabla 2. Diluyente UHT-C (para congelación).....	48
Tabla 3. Medio HEPES para fluorescencia	48
Tabla 4. Yoduro de propidio	48
Tabla 5. Aglutinina	48
Tabla 6. Tratamientos del Experimento 1	52
Tabla 7. Tratamientos del Experimento 2	53



INDICE DE ANEXOS.

Anexo 1. Valores promedios (\pm EEM) de motilidades y velocidades de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas.....	104
Anexo 2. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros de relación y progresividad de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas.....	105
Anexo 3. Valores promedios (\pm EEM) de integridad de las membranas espermáticas por subcategorías y totales de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas. ...	106
Anexo 4. Valores promedios (\pm EEM) de motilidades y velocidades de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas	107
Anexo 5. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros de relación y progresividad de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas.	108
Anexo 6. Valores promedios (\pm EEM) de subcategorías de estado de membrana plasmática y acrosomal de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas.....	109
Anexo 7. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros cinéticos registrado por el sistema CASA de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y congeladas – descongeladas.	110
Anexo 8. Valores promedios (\pm EEM) de subcategorías del estado de las membranas espermáticas de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y congeladas – descongeladas.	111
Anexo 9. Recolección de semen mediante vagina artificial (VA).....	112
Anexo 10. Pre-dilución semen 1:1, almacenamiento y traslado al laboratorio.....	112
Anexo 11. Procesamiento de las muestras en el laboratorio.....	112
Anexo 12. Preparación de las dosis de L-carnitina.....	113
Anexo 13. Análisis de las muestras en el sistema CASA y fluorescencia	113
Anexo 14. Crioconservación.....	114

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Gabriela Micaela Peláez Zhingri en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 20 de octubre de 2021



Gabriela Micaela Peláez Zhingri


C.I: 0105500599

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

María Paula Palacios Aguilar en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

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

Cuenca, 20 de octubre de 2021.



María Paula Palacios Aguilar.

C.I: 0104793146

Cláusula de Propiedad Intelectual

Gabriela Micaela Peláez Zhingri, autora del trabajo de titulación "Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de octubre de 2021

A handwritten signature in blue ink, reading "Gabriela Peláez", is written over a horizontal line.

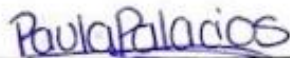
Gabriela Micaela Peláez Zhingri

C.I: 0105500599

Cláusula de Propiedad Intelectual

María Paula Palacios Aguilar, autora del trabajo de titulación "Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 20 de octubre de 2021.



María Paula Palacios Aguilar.

C.I: 0104793146



AGRADECIMIENTOS.

Queremos agradecer a Dios por guiarnos paso a paso en nuestro camino universitario y darnos la fuerza y perseverancia para alcanzar esta meta, la cual nos permite desarrollarnos como médicos veterinarios zootecnistas.

A nuestros padres, hermanos y amigos quienes estuvieron en todo momento apoyándonos a lo largo de nuestra carrera universitaria.

Al Dr. Diego Andrés Galarza por dirigir esta tesis brindándonos su experiencia, conocimientos y paciencia, y por confiar en nosotras y nuestras capacidades para realizar este proyecto.

A los miembros del tribunal por brindarnos su tiempo y consejos para mejorar este proyecto de tesis.

Un agradecimiento especial al Dr. Xavier Palacios y al Ing. Paulo Palacios quienes nos abrieron las puertas de sus criaderos de equinos, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible esta investigación.

Y finalmente agradecemos al técnico docente del laboratorio de Biotecnología de Irquis de la Universidad de Cuenca, Dr. Xavier Samaniego por el apoyo durante el trabajo de campo en el laboratorio.

Paula y Gabriela.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis de graduación a mis pilares fundamentales que son Dios y mis padres, Javier y Cristina por su apoyo incondicional durante toda mi carrera universitaria.

Y también le dedico a mi compañera Gabriela Peláez, ya que con su compañía y conocimientos compartidos estamos cumpliendo esta meta juntas.

María Paula Palacios Aguilar.



DEDICATORIA.

Dedico esta tesis primero a Dios, por haberme dado la vida y guiarme a lo largo del camino de formación profesional. A mis padres, Rolando y Esperanza, por ser los pilares fundamentales durante mi camino, ya que gracias a su esfuerzo y apoyo incondicional soy la persona que soy. A mi hermano Sebastián, mis tías y mi abuelito Víctor que siempre me han brindado su apoyo y cariño. A mis amigos y amigas que han estado a lo largo de mi camino en la vida universitaria y de quienes guardo gratos momentos. A mis profesores que han sabido educarme con rectitud y profesionalismo, y muchos de ellos se han convertido en apreciados amigos que siempre han estado pendientes de mi con sus consejos. A mi compañera de tesis, Paula Palacios, ya que juntas logramos nuestra meta.

Gabriela Micaela Peláez Zhingri.



ACRÓNIMOS.

IA: Inseminación artificial

CASA: *Computer Assisted Semen Analysis*

ATP: Adenosín trifosfato

ROS: Especies reactivas de oxígeno

LPO: Peroxidación lipídica

LC: *L-carnitina*

UHT: *Ultra-high temperature*

ZP: Zona pelúcida

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

VAP: Velocidad promedio

LIN: Índice de linearidad

STR: Índice de rectitud

WOB: Índice de oscilación

ALH: Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza

BCF: Frecuencia de batida de flagelo

Hz: Hertz

VA: Vagina artificial

PI: Yoduro de Propidio

PNA-FITC: Aglutinina

IPIA: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto

IPDA: Membrana plasmática intacta, acrosoma dañado

DPIA: Membrana plasmática dañada, acrosoma intacto

DPDA: Membrana plasmática dañada, acrosoma dañado



1. INTRODUCCIÓN

El caballo peruano de paso es una raza originaria del Perú, caracterizada por una conformación y un paso (andar) único. La raza posee un paso lateral isócrono de cuatro tiempos rotos, conocido en español como paso llano. En el Ecuador, existen muchos ejemplares que están registrados en diferentes asociaciones (ej. Asopaso en el Azuay) (Terrones, 2004).

Actualmente, el cruzamiento se desarrolla por monta directa y muy poco se conoce sobre la criopreservación de esta raza y su respuesta individual. Solo se han reportado dos investigaciones que optimizan el uso de agentes crioprotectores penetrantes y ellos determinaron que las amidas (*dimetilacetaida* o *dimetilformamida*) son los mejores agentes para congelar semen de caballo peruano de paso (Vargas, 2013; Santiani et al., 2016).

En general, la criopreservación del semen equino sigue constituyendo un hándicap tecnológico debido a las bajas tasas de criosupervivencia celular y, consecuentemente, a las bajas tasas de fertilidad obtenidas con el semen congelado – descongelado después de la IA (Amidi et al., 2016). La criopreservación de esperma equino incluyen varios procesos que provocan cambios físicos, estructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides. Sin embargo, este mismo proceso resulta ser deletéreo para una subpoblación importante de espermatozoides de un eyaculado (Moreno & Galarza, 2019).

En efecto, el proceso de criopreservación del semen equino provoca daño celular, reducción de la viabilidad y, en consecuencia, reducción de la capacidad fecundante de algunos espermatozoides (Blottner et al., 2001). Por lo tanto, los protocolos de congelación están direccionados a buscar nuevos diluyentes y aditivos en interacción con las curvas de congelamiento que permitan incrementar la supervivencia celular (Moreno & Galarza, 2019). Por otro lado, se conoce que durante el almacenamiento en frío (refrigeración ej. 5 °C), disminuyen las características funcionales y su integridad celular (ej. disminución de la motilidad y daño de la membrana plasmática y acrosomal) (Banihani et al., 2014).



Esta disminución de la capacidad funcional ha sido demostrada por el incremento del estrés oxidativo debido a la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres (ej. H_2O_2 , O_2^- and OH^-) (Gibb et al., 2015) y la peroxidación lipídica (LPO) que causan interrupción y alteración del potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), fragmentación del ADN, inversión en la membrana de la fosfatidilserina y activación de caspasas y, en efecto, disminución de la motilidad (Moreno et al., 2013).

La criopreservación, reduce la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides y solo un porcentaje (ej. aproximadamente, 60 a 70% de espermatozoides refrigerados – calentados, y el 40 - 50% de espermatozoides congelados – descongelados) mantienen su integridad, funcionalidad y capacidad fecundante (O'Brien et al., 2019).

Por lo tanto, para mitigar los efectos deletéreos propios de la criopreservación, se ha estudiado el efecto de varios diluyentes de base sintética y no sintética; incorporación de fuentes de fosfolípidos de origen vegetal (ej. Lecitina de soya) (Lecitina et al., 2020) y animal (ej. Yema de huevo); agentes crioprotectores penetrantes (ej. Glicerol) y no penetrantes (ej. Sacarosa); y la suplementación de varios aditivos con efecto antioxidante o estimulador de locomoción. El efecto de estos aditivos – antioxidantes se ha limitado a la mejora en las características cinéticas de integridad de membranas espermáticas después de la congelación – descongelación de espermatozoides equinos (Ortega et al., 2003).

La *L-carnitina* (LC), es un aditivo y antioxidante resultante de la síntesis de dos aminoácidos esenciales como la lisina y metionina, que ha demostrado tener un efecto antioxidante, crioprotector y estimulante de locomoción en espermatozoides humanos (Agarwal & Said, 2004), toro (Banihani et al., 2014), carnero (Galarza et al., 2020), ratón (Aliabadi et al., 2012), cerdo (Kozink et al., 2004) y animales silvestres (El-Raey et al., 2016). La LC desempeña un importante papel en el transporte de ácidos grasos de cadena corta, media y larga hacia las mitocondrias para la oxidación- β y producción de energía (ATP) a nivel celular disponible para su uso e influye positivamente sobre la motilidad espermática.



En este sentido, la presente investigación demostró el efecto antioxidante de la LC adicionada a dos diluyentes de base no sintética (ej. Proteínas micelares de leche desnatada) actualmente usados en la criopreservación. Esta suplementación de LC hipotetizó el incremento de los parámetros de locomoción al facilitar la fosforilación oxidativa, generación de ATP y disminuir el estrés oxidativo (incremento de la producción de ROS y LPO) bajo condiciones de refrigeración y congelación. Así mismo, se planteó la hipótesis de que la LC podría frenar los efectos deletéreos propios del proceso de criopreservación al ser revelado su efecto crioprotector como ha sido evidenciado en esperma de otras especies.

Finalmente, nosotros supusimos que la interacción entre la LC y la yema de huevo (como protector de la membrana plasmática contra del choque de frío), podría potencializar el efecto crioprotector como ha sido evidenciado en esperma de carnero (Galarza et al., 2020). Además, esta investigación expuso el efecto de la LC sobre muestras espermáticas individuales y agrupadas (pools), frescas y criopreservadas, con el fin de controlar, en cierta medida, el factor de variabilidad entre reproductores equinos.



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la *L-carnitina* suplementada a dos diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos refrigerados y congelados-descongelados.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración óptima de LC adicionada a los diluyentes UHT (leche desnatada+ 6% yema de huevo) e INRA-96®, basadas en una mejor respuesta cinética de esperma equino refrigerado a largo plazo.
- Evaluar el efecto de la LC suplementada a diluyentes sobre la criosupervivencia celular basada en motilidad e integridad de las membranas plasmática y acrosomal después de los procesos de refrigeración y congelación-descongelación.



3. REVISIÓN DE LITERATURA.

3.1 Características del espermatozoide.

La célula espermática es haploide diferenciada, producida en la espermatogénesis que tiene lugar en el túbulo seminífero de los testículos, en donde ocurre la proliferación, maduración y diferenciación celular; cuya función es el transporte del genoma masculino y fusión con el ovocito, dando como resultado un nuevo individuo. En el epidídimo se da la maduración final de los espermatozoides por su ambiente idóneo para su almacenamiento, en donde adquiere sus características de motilidad y capacidad de fecundación (Ortega, 2007).

La espermatogénesis ocurre en una determinada región del epitelio del túbulo seminífero, en donde las células de Sertoli actúan como soporte estructural y nutricional; la duración de cada ciclo es de 12,2 días y la espermatogénesis completa toma aproximadamente 4,5 ciclos o 57 días en los sementales equinos (Smorag, 2002).

3.2. Estructura del espermatozoide

El espermatozoide equino tiene una longitud aproximada de 61 – 86 μm (Varner, Gibb, & Aitken, 2015); consta de 5 estructuras, cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal; posee un núcleo muy condensado y una membrana plasmática muy sensible a los cambios térmicos, osmóticos, y mitocondrias (Ortega, 2007).

3.2.1. Cabeza

Las dimensiones de la cabeza del espermatozoide normalmente son de 6-7 μm de longitud, 3-4 μm de ancho y 2 μm de espesor (Banaszewska et al., 2015); está conformada por el acrosoma, el cual recubre los dos tercios anteriores del núcleo; mientras que la lámina postacrosomal está recubriendo el núcleo restante, el núcleo

se encuentra encerrado en una membrana de doble capa. La cromatina, es decir el ADN asociado a proteínas, que está dentro del núcleo de los espermatozoides maduros es altamente condensada, resultando aproximadamente el 5 – 10% de la célula somática (Varner et al., 2015).

El perforatorium se encuentra entre el acrosoma y la porción anterior del núcleo. La placa basal que se encuentra en la base del núcleo, se encarga de unir la cabeza del espermatozoide con el capitulum del cuello, la misma que se forma a partir del engrosamiento de la membrana nuclear (Brito, 2007).

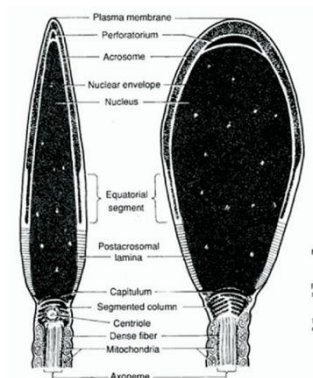


Fig. 1. Cabeza del espermatozoide.

3.2.3. Cuello

El cuello del espermatozoide equino es un corto segmento de unión entre la cabeza y la cola, el cual mide aproximadamente 0,5 μm , en su parte anterior está unida a la placa basal y posteriormente está unido a las fibras densas externas de la cola. El cuello contiene la pieza conectora, el centriolo proximal y varias mitocondrias pequeñas. A su vez la pieza conectora contiene columnas segmentadas y el capitulum (Banaszewska et al., 2015).

En la mayoría de los espermatozoides equinos la fosa de implantación y la placa basal están en posición excéntrica respecto al ancho de la célula, es por esto que se considera normal la cola abaxial. El centriolo proximal está entre las principales



columnas segmentadas, cuyo extremo anterior termina en la pieza conectora y se posiciona en un ángulo de 45 – 60 grados respecto al eje de la cola (Brito, 2007).

3.2.3 Acrosoma

Dentro de los espermatozoides maduros, el acrosoma contiene un gran suministro de moléculas activas, tanto dentro de la matriz acrosomal y como componentes de la membrana acrosomal interna. Estas moléculas, que incluyen una gran variedad de receptores para proteínas y enzimas hidrolíticas, son importantes para la adhesión y penetración en la zona pelúcida, así como también la interacción espermatozoide-oolema (Varner et al., 2015)

3.2.4. Cola espermática

En los mamíferos, el flagelo está dividido estructuralmente en 4 segmentos: la pieza conectora, la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza final. El axonema se extiende desde el remanente del centriolo junto a la fosa de implantación del núcleo, es la estructura central a lo largo de la longitud de la cola. La pieza conectora contiene el cuerpo basal y conecta la cabeza con la cola. La pieza intermedia contiene la mitocondria y la pieza final de la cola del espermatozoide contiene solo el axonema rodeado de su membrana plasmática (Lehti & Sironen, 2017).

3.2.6. Membrana del espermatozoide

La membrana espermática recubre a toda la célula, es una bicapa lipídica que en condiciones normales los grupos hidrófilos de los fosfolípidos forman la capa externa e interna de la bicapa lipídica y las colas hidrófobas se mantienen entre ambas capas (Olivera et al., 2006).

Durante la congelación, debido a la deshidratación se modifica esta disposición y genera la coalescencia de las cabezas o la exposición de las colas. La



composición lipídica está correlacionada con la tolerancia al shock por frío, mientras mayor proporción de esteroides frente a los fosfolípidos y mayor saturación de fosfolípidos con grupos acetilos, existirá una mayor tolerancia a los procesos de congelación-descongelación (Delgado-Bermúdez et al., 2019).

Los equinos poseen menor porcentaje de colesterol en relación al toro y cerdo, siendo de esta manera menos tolerante a los descensos de la temperatura. Además, contienen proteínas de membrana integradas entre los lípidos que actúan como poros o canales, receptores de unión, o presentan cadenas de carbohidratos que reaccionan con proteínas del medio (Ortega, 2011).

3.3. Fisiología espermática

Las funciones del epidídimo son maduración, transporte y almacenamiento de espermatozoides, los espermatozoides inmaduros provenientes de los conductos eferentes adquieren su capacidad de motilidad, estabilidad estructural y maduración en la cabeza y cuerpo del epidídimo; en la cola del epidídimo son almacenadas las células espermáticas, en donde mantienen su motilidad y capacidad fecundante (van der Linden et al., 2020).

El transporte de los espermatozoides por el ducto epididimario a través de la cabeza y cuerpo del epidídimo dura aproximadamente de 4 a 5 días, y no es influenciado por la frecuencia de eyaculación. En un semental cuyo semen ha sido colectado recientemente, la cola del epidídimo contiene del 53 - 62% de la reserva de semen extragonadal; el ducto deferente contiene alrededor del 4 - 5,3%, y el ampulla 2 – 6.7% de semen (Little & Holyoak, 1992).

3.3.1 Maduración.

Los espermatozoides formados durante la espermatogénesis y espermiogénesis en los testículos, están inactivos durante su transporte a lo largo del epidídimo. Los espermatozoides completamente desarrollados se almacenan en el segmento inicial del epidídimo, los cuales transitan a través de la red de testis y el



conducto eferente; estos espermatozoides no poseen movilidad o tienen una ligera motilidad, pero no poseen capacidad fecundante, cuya capacidad es adquirida durante el tránsito por el epidídimo hacia la cola (Twenner et al., 2017).

Dicha maduración espermática consiste en muchos cambios fisiológicos para que el espermatozoide adquiera motilidad, habilidad para reconocer y adherirse en la zona pelúcida, y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Los cambios más visibles es el desprendimiento de la gota citoplasmática, reducción del tamaño, cambio en la forma del segmento apical, cambio de apariencia del contenido acrosomal, cambios en la densidad y distribución de las partículas de la membrana, además el acrosoma sufre una remodelación estructural durante el cual varias proteínas experimentan un proceso postraducciona l y compartimentación (Sadurni, 2020).

Además, suceden varios cambios químicos como modificaciones de la composición de esteroides y glicoproteínas de la membrana plasmática, extensa reticulación nuclear de las protaminas por enlaces disulfuro, aumento de la carga negativa en la superficie total, reubicación de los antígenos superficiales y adición, eliminación o modificación de las proteínas superficiales; también durante el tránsito existe una pérdida progresiva y selectiva de los fosfolípidos que componen la membrana plasmática, lo cual genera una elevada proporción de colesterol que combinado con el mantenimiento activo de la distribución asimétrica de fosfolípidos estabiliza la membrana de la célula madura que se almacena en la cola del epidídimo (Sostaric et al., 2008).

La motilidad adquirida durante la maduración quizá se deba a eventos de fosforilación y desfosforilación de las proteínas flagelares, en donde los cambios son regulados por mediadores intracelulares como el AMP cíclico, calcio y pH, derivados del ambiente epididimal (Usuga, 2017).

Los eventos desencadenados por la oxidación del tiol generan la estabilización, mediante enlaces de disulfuro, de las fibras densas externas del flagelo; la



fosforilación proteica es el resultado de la actividad de las proteinquinasas y fosfatasas, éstas últimas tienen una mayor actividad en los espermatozoides inmóviles del cuerpo del epidídimo que los espermatozoides móviles de la cola del epidídimo (Sostaric et al., 2008).

3.3.2 Capacitación.

La capacitación es una serie de eventos que sufre un espermatozoide cuando entra en contacto con el tracto reproductivo femenino, estos cambios incluyen una reorganización de las proteínas, metabolismo de los fosfolípidos, reducción de los niveles de colesterol, hiperactivación, incremento de la permeabilidad y fluidez de la membrana, afluencia de calcio y bicarbonato, incremento del pH intracelular, activación de cinasas e incremento en la fosforilación de la tirosina (Arroyo-Salvo et al., 2019).

Dichos cambios con la subsecuente reacción acrosomal y los eventos irreversibles de exocitosis son esenciales en el espermatozoide para unirse y penetrar en la zona pelúcida y consecuentemente fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Durante la hiperactivación se dan cambios en la motilidad espermática para permitir el avance de los espermatozoides a través del oviducto, al permitir que estos se muevan fuera del epitelio del oviducto, y proporcionar el empuje móvil necesario para que el espermatozoide pueda penetrar en la zona pelúcida (Rathi et al., 2001); la hiperactivación consiste en un cambio en el patrón del movimiento flagelar rectilíneo a curvilíneo dando como resultado un movimiento circular o en forma de estrella (Arroyo-Salvo et al., 2019).

3.3.3 Reacción acrosomal.

Los espermatozoides realizan su última etapa de maduración que permite la fertilización, cuando se acercan al ovocito, y esto se debe a una cascada proteolítica desencadenada en la capacitación espermática, que abarca una serie de eventos



conocidos como exocitosis acrosomal, en donde la membrana acrosomal externa se desprende, liberando el contenido de la vesícula acrosomal y dejando expuesta la membrana acrosomal interna (Swegen et al., 2019).

La reacción acrosomal está determinada por inductores fisiológicos como ZP3, glicoproteína constituyente de la zona pelúcida; y progesterona presente en las células del cúmulo ooforos y en el fluido de los folículos preovulatorios; además el ion bicarbonato es esencial para la capacitación espermática y juega un papel muy importante en la preparación del espermatozoide para la reacción acrosomal (Rathi et al., 2003).

Durante la reacción acrosomal, la membrana exterior se fusiona con la membrana plasmática suprayacente, de esta manera crea vesículas híbridas y poros que conducen a la liberación y exposición del contenido acrosomal (Varner et al., 2015). Para estos eventos se requieren de enzimas hidrolíticas liberadas para disolver la matriz-ZP alrededor del espermatozoide que penetró y permitir que el espermatozoide ingrese al espacio peri vitelino; cuando la reacción acrosomal inicia demasiado pronto, es decir antes de la unión ZP, las enzimas se perderán y los espermatozoides no serán capaces de penetrar la zona y por ende fertilizar (Gadella et al., 2001)

Se ha reportado que varios factores físicos o químicos in vitro pueden inducir la reacción acrosomal, debido a que los espermatozoides capacitados tienen una membrana plasmática inestable la cual es muy sensible a factores estresantes del medio; por lo tanto la exposición del calcio ionóforo a la presencia de Ca^{2+} puede inducir la fusión de la membrana plasmática a la subyacente membrana acrosómica de los espermatozoides capacitados; sin embargo en los espermatozoides no capacitados, esto no sucede así, debido a que los primeros tienen membranas plasmáticas frágiles (Gadella et al., 2001)

Entre otros eventos, también se da la fosforilación de numerosas proteínas de membrana, para lo cual están involucradas quinasas reguladoras como la



proteinkinasa A (PKA), proteinkinasa C (PKC), proteinkinasa G (PKG), proteinkinasa tirosina (PTK); están involucradas en la vía de transducción RA-Progesterona. Además se ha demostrado que el bicarbonato es PKA-dependiente, e induce rápidamente los cambios en la arquitectura lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides (Rathi et al., 2003).

3.4 Obtención de espermatozoides equinos

3.4.1 Recolección y evaluación de semen

Para la recolección de semen equino se usa comúnmente vaginas artificiales, con el propósito de obtener semen con fines de examinación o procesamiento para inseminación artificial; éstas vaginas artificiales son lubricadas con varios tipos de lubricantes dependiendo de la preferencia del colector y las dificultades encontradas durante el proceso de colecta; siendo los más utilizados de varias marcas de uso humano, cuyos componentes no son espermicidas (Serafini et al., 2019).

3.4.2 Criopreservación

El objetivo de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a bajas temperaturas. La criobiología entiende los efectos de las temperaturas bajas sobre el tiempo biológico, ya que el frío enlentece las reacciones bioquímicas celulares; sin embargo, durante este proceso se pueden generar alteraciones en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, las cuales pueden alterar la membrana celular, los organelos y demás estructuras celulares. Se debe tener en cuenta que los momentos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial de congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Avila et al., 2006).

La criopreservación se refiere al mantenimiento de la vida celular a temperaturas bajo cero por un tiempo definido; cuyo almacenamiento a largo plazo se logra cuando las células reproductivas detienen su metabolismo y sus reacciones



celulares se retardan. La temperatura del nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), permite que a partir de estas bajas temperaturas no haya actividad bioquímica detectable posiblemente debido a la falta de energía térmica; además la ausencia de agua limita todos los procesos metabólicos (Principal et al., 2006)

El pequeño tamaño de los espermatozoides y su gran superficie les hacen menos susceptibles al potencial daño de la criopreservación; sin embargo, la supervivencia celular depende de la velocidad de enfriamiento y descongelación impuesta durante los protocolos del proceso. La velocidad de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, además debe ser lo suficientemente rápida para no causar una deshidratación celular innecesaria (Pérez-Osorio et al., 2018).

Las estructuras cristalinas sólidas o hielo se forman del agua de enfriamiento que se encuentra por debajo de su punto de congelación, es más ligera y ocupa un mayor volumen en relación al agua líquida, la expansión de estos cristales de hielo durante la solidificación del agua es el principal factor que aumenta la presión y tienen un efecto de cizallamiento sobre las organelas intracelulares; provocando un daño celular considerable (Gonz, 2017).

Ocurre también que cuando la solución se concentra mucho a medida que baja la temperatura, conduce a un choque osmótico; pueden haber otros daños celulares por la disparidad del gradiente de osmolalidad que genera la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) perjudiciales para los espermatozoides (Sharma & Sharma, 2020).

El proceso de congelación-descongelación implica procesos de enfriamiento y calentamiento que pueden ser letales para los espermatozoides especialmente en el rango de temperatura crítica que va desde los $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gamarra, 2020). La célula espermática se somete dos veces a los cambios de temperatura durante los procesos de enfriamiento y calentamiento. En el calentamiento el agua reingresa al espermatozoide y por ende se restaura el volumen intracelular; sin embargo, esto



contribuye a la formación de cristales de hielo intracelulares y subsecuentemente el daño celular (Sharma & Sharma, 2020).

3.5 Crioprotectores

3.5.1 Agentes penetrantes.

Actualmente existen varios agentes penetrantes (AP), como el glicerol, primero en ser descubierto; dimetil sulfoxido (DMSO), Etilen glicol (EG) y propandiol (propylen glycol). La habilidad de cada uno de estos, como protectores frente a efectos mecánicos y osmóticos de los procesos de congelación depende de las propiedades de cada sustancia. Estos agentes penetrantes tienen una solubilidad mayor al agua a bajas temperaturas, con el objetivo de facilitar su penetración a través de las membranas biológicas, además son mínimamente tóxicos (Castro & González, 2017).

Su tamaño es relativamente pequeño (<100 Daltons), y su naturaleza anfílica le permite penetrar en la célula para ejercer sus efectos, estos agentes interactúan con el agua a través de los enlaces de hidrogeno, generando que el punto de congelación del agua se deprima y exista menos moléculas de agua disponibles para interactuar entre ellas y formar puntos críticos de nucleación requeridos para la formación de cristales. La vitrificación es la formación de agua solida irregular con estructura amorfa, esta se logra mediante el uso de un crioprotector junto a una adecuada velocidad de enfriamiento (Whaley et al., 2021).

3.5.2 Agentes no penetrantes

Los agentes no penetrantes (ANP) no ingresan al medio intracelular, ya que ejercen su actividad fuera de la célula espermática, son moléculas largas y unidos covalentemente formando polímeros, dímeros o trímeros. Los agentes más usados son: polietilen glicol (PEG), Polivinilpirrolidone (PVP), rafinosa, sucrosa y trehalosa.



Estos agentes inducen la vitrificación mediante el mismo mecanismo que los agentes penetrantes pero extracelularmente y en menor medida (Whaley et al., 2021).

3.6 Concentración espermática.

Una adecuada medida de concentración espermática, motilidad total y progresiva forman parte fundamental para la preparación de una dosis de semen destinada a la inseminación artificial, de esta manera nos aseguramos que un adecuado número de espermatozoides con motilidad progresiva sean depositados en el tracto reproductor femenino y obtener una óptima fertilidad. Generalmente se acepta que las yeguas sean inseminadas con una concentración de 500×10^6 de espermatozoides/mL con motilidad progresiva, 1×10^9 espermatozoides totales en semen refrigerado y 800×10^6 a 1×10^9 espermatozoides/mL, cuando se usa semen congelado/descongelado (Dini et al., 2019).

3.7 Motilidad Espermática.

La motilidad espermática es una medida muy importante del análisis espermático en una muestra seminal, a pesar de que tenga una pobre correlación con una verdadera fertilidad. Una estimación microscópica manual de la motilidad es imprecisa, inadecuada y subjetiva; mientras que una estimación visual es barata y simple, sin embargo, requiere de experiencia, entrenamiento y monitoreo del personal de laboratorio (Castro & González, 2017).

Es por ello, que hoy en día se usa el Análisis Espermático Asistido por Ordenador (CASA, por sus siglas en inglés *Computer Assisted Semen Analysis*), que suministra información precisa y adecuada sobre una variedad de características de movimiento de los espermatozoides, además suministra una evaluación objetiva de la motilidad. Las medidas de la motilidad espermática pueden verse afectadas por los ajustes de la técnica del equipo, velocidad y número de fotogramas, algoritmos



usados; así como también la concentración espermática y los diluyentes usados pueden afectar estas medidas (Hoogewijs et al., 2012).

Hay dos tipos de movimiento, el activo que es el que permite avanzar en el aparato reproductor de la hembra y existe también el movimiento hiperactivo el cual lo realizan los espermatozoides capacitados con una mayor amplitud y fuerza para penetrar los ovocitos (Duque et al., 2017).

El axonema es el que le da la motilidad al espermatozoide para lo cual se necesita ATP que lo proporcionan las mitocondrias mediante la fosforilación oxidativa, este ATP puede venir también de sustratos extracelulares como la glucosa o fructosa (Ortega, 2011). Un semental se considera apto para congelación al tener valores de motilidad progresiva entre el 60-70 % en semen fresco y 30-35% en semen post-descongelación (Gutiérrez, 2014).

3.8 Análisis Espermático Asistido por Ordenador (CASA)

Este sistema provee un método objetivo de evaluar la motilidad espermática, los sistemas actuales CASA, tienen además la habilidad de analizar la morfología y concentración espermática. Este sistema usa un microscopio, una cámara de video y un software para el análisis. El sistema recoge múltiples imágenes del movimiento espermático (60 cuadros por segundo con 40 cuadros analizados) que proporciona datos para el sistema informático que da como resultado una trayectoria lineal del movimiento individual del esperma (Dascanio & Miller, 2021).

3.8.1 Motilidad espermática.

- a) Motilidad total:** se mide en %
- b) Motilidad parcial:** se mide en %
- c) Velocidad curvilínea (VCL):** es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo y se mide en mm/s



- d) **Velocidad rectilínea (VSL):** velocidad del recorrido rectilíneo del punto inicial al final y se mide en mm/s
- e) **Velocidad promedio del espermatozoide (VAP):**
- f) **Índice de linealidad (LIN):** es el cociente entre la VSL y la VCL, se mide en %
- g) **Índice de rectitud (STR):** Es el cociente entre la VSL y VAP, se mide en %
- h) **Índice de oscilación (WOB):** es el cociente entre la VAP y VCL, se mide en %
- i) **Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH):** es el desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides motiles, se mide en mm/s
- j) **Frecuencia de batida (BCF):** es la frecuencia de batida del flagelo de los espermatozoides motiles, se mide en Hz.

3.9 Mecanismos de crio lesión en el semen equino

La crio preservación se utiliza para el mantenimiento a largo plazo de los ovocitos, embriones y espermatozoides, en el cual los protocolos consisten en un descenso de temperatura lento para los espermatozoides, durante este proceso los espermatozoides sufren daños como los cambios bruscos de temperatura y el estrés oxidativo que pueden ser letales, es por eso que la fertilidad del semen descongelado es menor (Ortega, 2011).

3.9.1. Estrés osmótico.

Durante este proceso se puede provocar un shock osmótico, cuando los espermatozoides se diluyen en el medio de congelación que es hiperosmolar ya que a medida que el agua se congela aumentan los solutos y aumenta la osmolaridad, por lo que los espermatozoides se deshidratan y disminuyen su volumen, y cuando se descongela se produce un shock hipo osmótico, ya que los espermatozoides regresan



a su osmolaridad normal, lo cual afecta a la membrana y al citoesqueleto del espermatozoide (Ortega, 27011). Existe un rango de tolerancia osmótica espermática que en el equino esta entre los 450 y los 1500 mOsm/Kg (Gutiérrez, 2014)

3.9.2 Estrés Térmico.

Otro daño que puede causarse es el shock térmico que genera cambios en la membrana provocando una pérdida de integridad, funcionalidad y fluidez (C. Ortega, 2007), durante los cambios térmicos en la crio preservación se afecta principalmente la membrana plasmática y acrosomal provocando alteraciones en la distribución y función de las proteínas de membrana, como consecuencia se altera la viabilidad espermática (Gutiérrez, 2014).

3.9.3. Estrés oxidativo.

Durante el metabolismo oxidativo fisiológico se producen radicales libres que funcionan en la capacitación, reacción acrosómica y capacidad de fecundación. El problema radica en un desequilibrio en la producción o degradación de estas sustancias lo que da lugar a la producción de desechos adversos sobre los espermatozoides, los cuales afectan a la membrana plasmática, el ADN y la motilidad (Gutiérrez, 2014); además producen muerte celular o daños subletales que disminuyen la vida media espermática y capacidad de fecundación (Ortega, 2007).

3.9.4. Apoptosis.

Es un proceso de muerte celular programado desencadenado a través de la vía extrínseca, iniciado por los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral; o la vía intrínseca activada en células con alteraciones en la homeostasis debido a estrés térmico, hipoxia o radicales libres, o también como mecanismo fisiológico para eliminar los espermatozoides del tracto reproductor de la hembra. Los procesos de



congelación y descongelación inducen a fenómenos similares a la apoptosis (Gutiérrez, 2014).

3.10 Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen equino.

Los diluyentes usados para la criopreservación compensan las alteraciones que ocurren durante la congelación del semen equino, debido a que es posible la adición de diversos aditivos con propiedades antioxidantes que mejoren la criotolerancia, efecto que se puede relacionar con la capacidad antioxidante total del diluyente; según (Duque et al., 2017) concluyeron que al añadir quercetina, fosfatos y carbonatos existe un incremento en la capacidad antioxidante total del diluyente de congelación y además mejora la tolerancia del semen a los procesos de congelación, mismo efecto encontrado con la adición de ergotioneina en semen de carneros (Restrepo et al., 2016).

Este efecto se debe a que los fosfatos además de regular el pH, actúan como un quelante de especies reactivas de oxígeno (ROS) y tiene un potente efecto antioxidante contra la oxidación lipídica debido a la unión de iones metálicos que actúan como catalizadores de la oxidación y por ende reduce la alteración funcional y estructural de la membrana plasmática de los espermatozoides (Duque et al., 2017).

Existen dos tipos de antioxidantes, los enzimáticos y los no enzimáticos; dentro del grupo de antioxidantes enzimáticos se encuentran el glutatión peroxidasa (GTx), Glutatión reductasa (GR), Superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). En el grupo de los antioxidantes no enzimáticos o sintéticos están el glutatión reducido (GSH), purato, ácido ascórbico, vitamina E (alfa tocoferol), carotenoides (betacaroteno), taurina, hipotaurina, selenio y zinc (Amidi et al., 2016).



3.10.1 Catalasa

La actividad más importante de la catalasa es frente al peróxido de hidrogeno al contribuir con su degradación y por ende mantener el líquido seminal, la catalasa cumple un papel protector contra los radicales libres (Barwe et al., 2003), además tiene un efecto protector sobre la motilidad de los espermatozoides equinos cuando estos radicales libres son generados por neutrófilos o por el sistema xantina-xantina-oxidasa (Baumber et al., 2005)

Se ha demostrado que la enzima catalasa a concentraciones de 500 UI/ml en semen refrigerado de camellos, aumento el porcentaje de motilidad espermática y disminuyo el porcentaje de espermatozoides muertos, anomalidades espermáticas y daño acrosomal (Medan et al., 2008).

3.10.2 Superóxido dismutasa

El superóxido dismutasa es una de las enzimas antioxidantes más importantes del sistema altamente especializado en eliminar ROS, producido por las células de Sertoli y Leydig en el testículo. En un estudio realizado en humanos se demostró que la concentración de SOD seminal tiene una actividad positiva sobre la concentración y motilidad espermática (Yan et al., 2014).

El superóxido dismutasa cumple un rol protector de los radicales libres, ya que convierte el superóxido en peróxido de hidrogeno (H_2O_2), para que posteriormente la catalasa convierta en agua y oxígeno, y finalmente se elimine la toxicidad de los radicales libres y disminuya la peroxidación lipídica (Amidi et al., 2016).

3.10.3 Vitamina E

La adición de la vitamina E en espermatozoides equinos va a reducir la peroxidación de lípidos (Baumber et al., 2005), debido a su potente capacidad de



romper las cadenas lipídicas. La adición de la vitamina E mejora la motilidad progresiva y la viabilidad seminal. El alfa tocoferol que compone la vitamina E, es el que protege la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides frente a los radicales libres y la peroxidación lipídica. Se ha demostrado su acción durante la congelación en espermatozoides bovinos por su acción protectora en la membrana plasmática. Al suplementar la vitamina E también disminuye la apoptosis y fragmentación del ADN (Amidi et al., 2016)

La vitamina E solo puede ser efectiva en combinación con la vitamina C, debido a que la vitamina C dona electrones al radical to-coperoxil de la vitamina E oxidada, ayudando a proteger la membrana lipídica de la peroxidación (Membrillo et al., 2011).

3.10.4 Glutati3n

El glutati3n es un trip3ptido de tiol, sintetizado a partir de los amino3cidos glutamato, ciste3na y glicina cuyas funciones biol3gicas es mantener las condiciones redox intracelulares, funciona como un antioxidante de compuestos ex3genos y end3genos, actúa como un dep3sito fisiol3gico de ciste3na; este compuesto es un reservorio natural del efecto redox, que es utilizado para defender a las c3lulas frente al estr3s oxidativo, participa en la regulaci3n de s3ntesis de prote3nas, desintoxicaci3n celular y s3ntesis de leucotrienos (Restrepo et al., 2013)

La acci3n antioxidante del glutati3n est3 dada por su grupo sulfhidrilo (SFH), el cual puede presentarse en las formas glutati3n reducido (GSH) y oxidado (GSSG). El glutati3n reducido ataca contra las especies reactivas de ox3geno (ROS), mediante la acci3n enzim3tica de glutati3n reductasa y peroxidasa; en un estudio realizado se determin3 que la adici3n de 2,5 mM de Glutati3n al diluyente de congelaci3n en semen de equinos preserva la motilidad total e incrementa la viabilidad esperm3tica, motilidad progresiva e integridad de la membrana plasm3tica (De Oliveira et al., 2013).

Es decir, el glutati3n reductasa (GR) participa directamente sobre la neutralizaci3n de radicales libres, con lo cual disminuye la actividad del estr3s



oxidativo. En un estudio de semen humano, el glutatión posee una capacidad efectiva durante el proceso de congelación-descongelación, al reducir los niveles de radicales libres durante la congelación de espermatozoides, mejora la motilidad y mejora la integridad del ADN (Amidi et al., 2016)

3.10.5 Melatonina

Este aditivo deriva del triptófano, secretada por la glándula pineal durante la noche. Posee una actividad antioxidante, mejora las características seminales en varias especies, incluso en el humano. Su acción es dosis-dependiente en todos los parámetros de motilidad espermática. Mejora la viabilidad, motilidad, concentraciones de ATP intracelular, integridad del ADN, mantiene el acrosoma intacto y mejora la capacidad fecundante posdescongelación (Amidi et al., 2016).

En un estudio realizado en caprinos, la melatonina mejora la capacidad fecundante y la congelabilidad del semen (Tabarez et al., 2013). Debido a su naturaleza lipofílica, su acción antioxidante se basa en estabilizar las membranas internas mitocondriales y mejora la cadena de actividad de transporte de electrones, además en el medio de congelación les protege a los espermatozoides del estrés oxidativo, y aumenta la cantidad de espermatozoides con mitocondrias activas (Tamay & Velez, 2018).

3.10.6 Betahidroxitolueno

El hidroxitolueno butilado es un análogo sintético de la vitamina E, que se utiliza en la criopreservación de espermatozoides en diversas especies; su efecto protector antioxidante se debe a dos mecanismos, el primer mecanismo se basa en la incorporación del betahidroxitolueno en la membrana espermática, que genera mayor fluidez de la membrana y prevé el daño; el segundo mecanismo es reducir el daño potencial de los radicales de la peroxidación lipídica mediante la conversión en hidroperóxidos. En general la adición de este aditivo mejora la motilidad espermática, viabilidad e integridad acrosomal (Trzcińska et al., 2015).



La adición de este aditivo mejora la viabilidad de los espermatozoides refrigerados y congelados-descongelados (Tabarez et al., 2013)

3.11. *L-carnitina*.

La amina *L-carnitina* cumple diversos papeles metabólicos en los mamíferos, incluyendo al humano. La *L-carnitina* libre es una amina cuaternaria altamente polar, soluble en agua, cuyo peso molecular es de 162 y considerada un zwitterión. Su principal importancia biológica radica en su actividad mitocondrial, específicamente sobre la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Jeulin & Lewin, 1996).

3.11.1 Estructura química de la *L-carnitina*

Como muchos aminoácidos la carnitina se presenta en dos formas enantioméricas: L y D carnitina; la *L-carnitina* se encuentra presente en todas las células y otros productos naturales, mientras que la *D-carnitina* puede ser procesada mediante síntesis química y es un inhibidor competitivo de la *L-carnitina*. Dentro de las células vivas la *L-carnitina* se puede encontrar libre o unida a grupos acyl (Demarquoy, 2011). Para la biosíntesis de la *L-carnitina* se requiere de precursores que son dos aminoácidos esenciales, lisina y metionina y además de cofactores como la vitamina C, hierro, vitamina B6 y niacina (Potter et al., 2015).

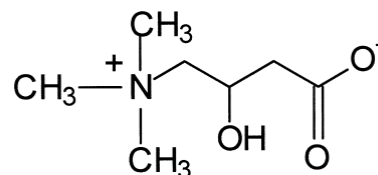


Fig 2. Formula estructural de la *L-carnitina* (Hoppel, 2003)

3.11.2 Metabolismo de la *L-carnitina*

La biosíntesis de la carnitina comprende una secuencia de cuatro reacciones enzimáticas catalizadas, cuyos sitios de producción son especialmente el hígado y riñón (Jeulin & Lewin, 1996). En la primera reacción se cataliza el TML (N^{ϵ} -trimethyllysine), a partir del aminoácido lisina en varios tejidos, resultando en un aminoácido no proteico, por la enzima catalizadora N^{ϵ} -trimethyllysine hidrolasa; convirtiendo al TML en 3-hydroxy-TML (HTML). Luego la aldolasa específica divide el HTML en glicina y 4-N-trimethylaminobutyraldehído, el cual sucesivamente es oxidado en 4-N-trimethylaminobutyrate; finalmente se da su hidroxilación y se convierte en 3-hydroxy-4-N-trimethylamino-butyrate, más conocido como carnitina (Servillo et al., 2014).

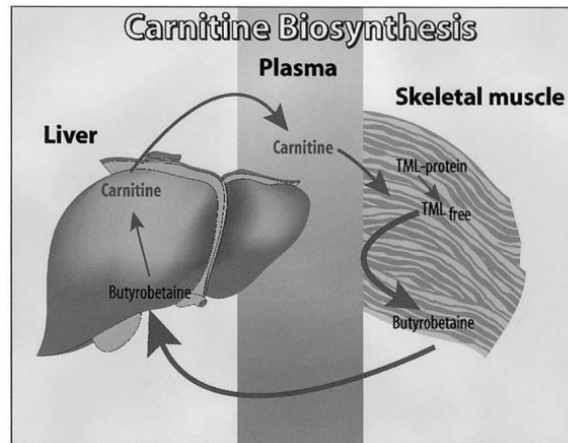


Fig 3. Biosíntesis endógena de la carnitina (Hoppel, 2003)

3.11.2 Función Metabólica.

Su función metabólica más conocida es su efecto ergogénico por su participación en el metabolismo de la grasa, ya que actúa como un vehículo para el transporte bidireccional de ácidos grasos activados a través de las membranas mitocondriales internas. Los ácidos grasos libres de cadena larga son activados en el citosol para formar esteres de acyl-CoA de diferente longitud de cadena (Harmeyer, 2002).



Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable para estos tioesteres de coenzima A, los grupos acyl se separan del enlace CoA y se unen a la L-carnitina para formar ésteres acyl-carnitina. Entonces los esterres de carnitina son transportados hacia la matriz mitocondrial mediante procesos enzimáticos, estando disponibles para la beta oxidación e inclusión de los restos de acyl al ciclo del ácido cítrico. En conclusión, la producción energética a partir de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga depende en gran medida de la función transportadora de la *L-carnitina* (Zeyner & Harmeyer, 1999)

Aparte de la producción y control de energía que realiza la *L-carnitina* en músculos y tejidos, realiza otras funciones como participar en el transporte de ácidos grasos activados de los peroxisomas a la mitocondria, de esta manera funciona como un cofactor en la producción de energía a partir de ácidos grasos de cadena media, piruvato y cuerpos cetónicos; tiene un efecto protector de las membranas celulares mediante el secuestro de cantidades excesivas de grupos acilo de cadena larga membranotóxicos, principalmente en el corazón; además tiene un efecto regulatorio de la gluconeogénesis y cetogénesis (Zeyner & Harmeyer, 1999).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1 Materiales físicos

- Guantes de examinación (látex)
- Mascarillas
- Caja de poliestireno de 31 x 30 x 29 cm
- Etiquetas de identificación
- Vagina artificial (VA) Tipo Hannover para equinos (Ref: 11220/0145, Minitube®, Alemania).
- Manga interior (goma) para VA Hannover (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania).
- Liners de plástico recortables y descartables
- Botella colectora de semen para VA equina (Ref: 11231/0200, Minitube®, Alemania).
- Tapa-anillo para botella colectora para VA equina (Ref: 11231/0301, Minitube®, Alemania).
- Filtro de nailon para semen tipo Colorado (Ref: 11231/0400, Minitube®, Alemania).
- Bolsa termo protectora para VA equina (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania).
- Rollo de papel secante
- Rollo de papel aluminio
- Termómetro digital
- Tubos Falcon de 15 mL
- Parafilm®M (Ref: P7793, Sigma-Aldrich)



4.1.2 Materiales biológicos

- Cuatro reproductores equinos: Caballos de Paso Peruano
- Eyaculados de semen de caballo.
- Leche desnatada tratada con ultra calor “UHT”: Leche Toni®, Empresa tonicorp, The Coca Cola Company, Guayaquil, Ecuador,
- Huevos de gallina (frescos)

4.1.3 Materiales Químicos.

- Solución fisiológica
- Agua milli-Q
- Lubricante K-Y Gel® (Ref: SKU 100021489, REBE)
- Nitrógeno líquido (NL₂, 70 Kg)

4.1.4 Materiales de laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas de 0 – 20 µL, 20 – 200 µL y de 200 – 1000 µL
- Microscopio de campo claro (CX-31, OLYMPUS®)
- Centrífuga de tubos Falcon de 15 mL
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0.9, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio de epifluorescencia D-FL, negative contrast, excitación entre 450-490 nm, y emisión de 520 nm) Eclipse model 50i; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.
- Filtros de membrana Minisart® (NML Syringe Filter 16555, pore size 0.45 µm, Sartorius, Germany)
- Tubos falcon 15 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubreobjetos
- Refrigerador común



- Pajuelas 0,25 mL
- Esterilizador UV
- Caja de poliestireno de 31 x 30 x 29 cm
- Tanque de nitrógeno líquido
- Baño María
- Estufa Memmert® (D-91126, Schwabach, Germany)
- Temocuople Digital thermometer® con sondas sensibles tipo K (Ref 6802 II)

4.1.5 Reactivos

- Diluyente INRA-96® (Ref: 016441, IMV technology, France)
- Diluyente INRA Freeze (Ref: 021727, IMV technology, France)
- Glicerol (Sigma, G912)
- L-carnitina (Ref: 8400920025, Sigma-Aldrich Chemical, Co.)
- Penicilin G-sodium salt (Sigma, P3032)
- Streptomycin sulfate salt (Sigma, S9137)
- Sacarosa (Sigma, S1888)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutunina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Bovine serum albumin, BSA (Sigma, A9418)

4.2 Metodología

4.2.1 Área de estudio

Las muestras de eyaculados de caballo fueron tomadas de la parroquia Chicti, cantón Paute, Provincia del Azuay. Posteriormente, el trabajo experimental sobre el procesamiento, congelación, descongelación y análisis de calidad espermática fueron realizados en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicado dentro de la Granja Irquis ($3^{\circ}04'48.1''S$ $79^{\circ}04'31.0''W$, altitud 2.648 metros sobre el nivel del mar) (Figura 2).



Fig 4. Ubicación del área de estudio (Azuay).

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2018.

4.2.2 Elaboración de diluyentes y medios

Los diluyentes y medios para esta investigación fueron elaborados en el mismo laboratorio mediante el uso de reactivos de las empresas SIGMA-Aldrich y Panreac S.A., a excepción de los diluyentes comerciales que fueron adquiridos de la casa IMV-technologies (Francia). Ambos diluyentes de base no sintética incluyeron en su



composición la leche desnatada de vaca con tratamientos previos de calor y purificación.

El primer diluyente fue realizado según lo descrito por Galarza et al. (2019). Para este propósito se usó una leche desnatada comercial (Leche Toni®, Empresa tonicorp, The Coca Cola Company, Guayaquil, Ecuador) tratada con altas temperaturas (*ultra high temperature*, UHT). Esta leche UHT fue suplementada con 6% (v/v) de yema de huevo inactivada. La inactivación de la yema de huevo fue realizada colocando en un vaso de precipitación de 50 ml, tapado con papel aluminio y colocando dentro de un incubador a 56°C durante 30 minutos. El diluyente se centrifugó a $4000 \times g$ durante 20 minutos a temperatura ambiente y entonces el sobrenadante fue recuperado en un vaso de precipitación estéril. Este diluyente centrifugado fue filtrado usando filtros de membrana estériles con 0,45 μm de tamaño de poro (Minisart® NML Syringe Filter 16555, pore size 0.45 μm , Sartorius, Germany). El diluyente fue medido el pH y la osmolaridad que osciló entre 6,8 a 7,2 y 300 a 320 mOsmol/kg, respectivamente. Finalmente, el diluyente fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso. Este diluyente fue llamado “UHT-R” (Tabla 1) que fue usado para al almacenamiento de las muestras espermáticas en refrigeración.

Por otro lado, el diluyente UHT-R fue suplementado con el 5% (v/v) de glicerol que fue usado para la congelación. Este diluyente de congelación llamado UHT-C (Tabla 2). Las fórmulas de detallan a continuación:

Tabla 1. Diluyente UHT-R (para refrigeración)

Producto	Cantidad
Leche desnatada UHT (ultra high temperature)	188 mL
Yema de huevo desactivada (incubación a 56°C por 30 minutos)	12 mL
pH: 6,8 a 7,2.	Osmolaridad: 300 a 320 mOsmol/kg

**Tabla 2.** Diluyente UHT-C (para congelación)

Producto	Cantidad
Diluyente UHT-R	190 mL
Glicerol (5%)	120 mL
pH: 6,8 a 7,2.	Osmolaridad: 300 a 320 mOsm/kg

El segundo diluyente no sintético a base de leche desnatada fue de uso comercial. El diluyente para refrigeración fue INRA-96® y para congelación fue INRA-Freeze®; ambos de la casa IMV-technologies (France).

Tabla 3. Medio HEPES para fluorescencia

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

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

Tabla 4. Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 mL

Alicuotar en dosis de 50 μ L

Tabla 5. Aglutinina

Reactivo	Cantidad
PNA-FITC aglutinina	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 mL

Alicuotar en dosis de 50 μ L



4.2.3 Diseño experimental

Esta investigación se desarrolló en dos experimentos. El Experimento 1 determinó la concentración más idónea de *L-carnitina* suplementada a los diluyentes UHT e INRA-96. Para este propósito, recolectamos nueve eyaculados de semen provenientes de 3 caballos de paso peruano (3 sesiones semanales / caballo). Cada eyaculado se dividió en dos alícuotas grandes para ser diluidas con ambos diluyentes base UHT-R e INRA-96, y suplementados con 0 (controles), 1mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM o 50 mM de *L-carnitina*. Las muestras espermáticas frescas y diluidas fueron refrigeradas a 5°C y evaluadas las características cinéticas e integridad de membranas a las 0, 48 y 96 horas de almacenamiento en frío.

El Experimento 2 involucró la concentración más óptima obtenida en el Experimento 1 (es decir, 25 Mm según los análisis obtenidos en la sección “Resultados”) y fue usado para determinar el efecto de la *L-carnitina* sobre la criosupervivencia espermática, ya sea bajo condiciones de refrigeración y congelación-descongelación. Para este propósito, se recogieron 16 eyaculados de semen de 4 caballos peruanos de paso fino (4 sesiones semanales / caballo) y se conformaron 8 agrupaciones de eyaculados (pools) elegidos al azar (2 eyaculados / pool). Cada Pool fue dividido en 2 alícuotas grandes, y entonces refrigeradas y congeladas respectivamente, con ambos diluyentes suplementados con *L-carnitina*. Asimismo, en cada diluyente, ya sea de refrigeración o congelación tuvieron sus controles sin la suplementación de *L-carnitina*. Los diluyentes usados en el Experimento 2 se resumen a continuación: para refrigeración: UHT-Co (control), UHT-LC, INRA-96-Co (control) e INRA-96-LC; y para congelación: UHT-Co (Control), UHT-LC, INRA-Freeze (control) e INRA-Freeze-LC (Ver detalles en Figura 5).

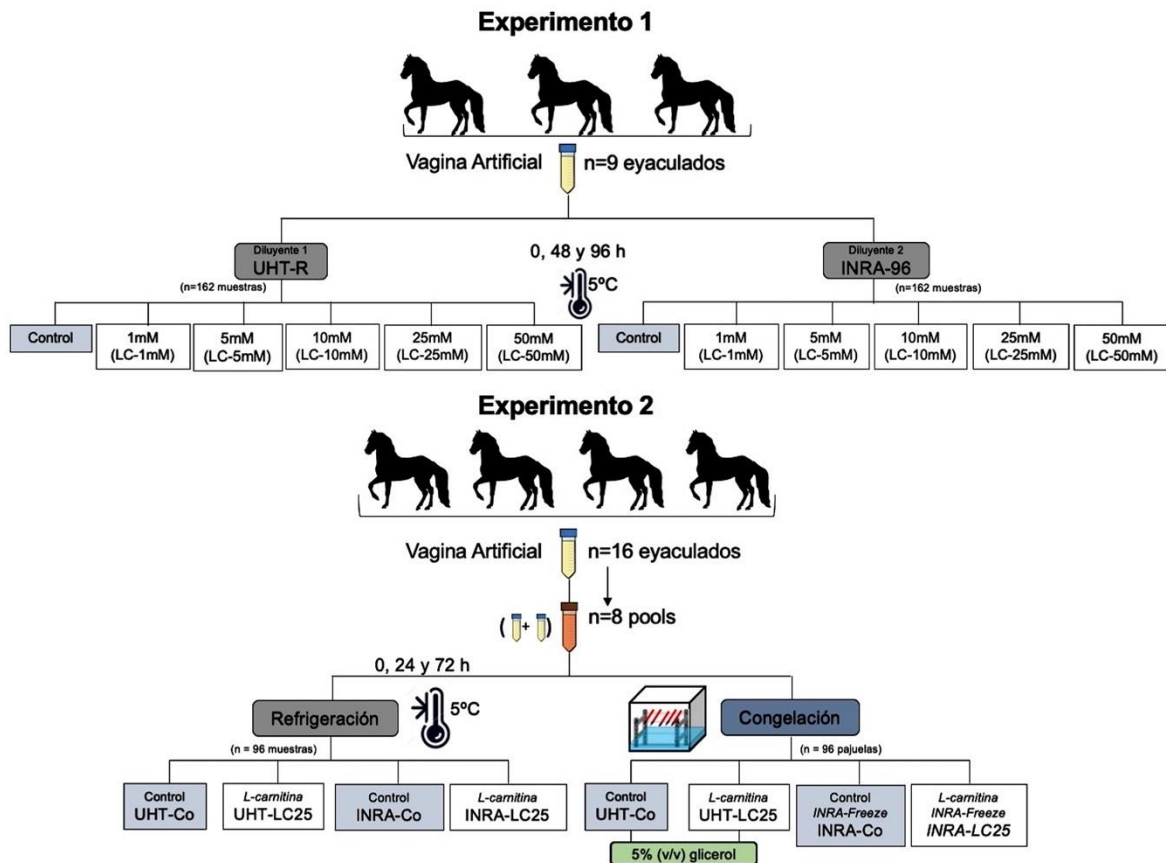


Fig 5. Diseño Experimental

4.3 Metodología para la investigación

4.3.1 Reproductores y recolección de semen

El proceso de recolección de semen fue realizado en cuatro caballos peruanos de paso fino de 5 a 12 años de edad, con un peso aproximado de 450 ± 50 kg de peso vivo, sexualmente maduros, clínicamente sanos y alojados en la finca “Las Marías” bajo una crianza estabulada y un sistema de alimentación basado en un 70% de forraje en materia verde y un 30% de concentrado con un 14% de proteína. Los reproductores no presentaron afecciones ni enfermedades en tracto reproductor masculino evaluado después de un examen objetivo general realizado previo a los experimentos.



La finca “Las Marías” es un predio libre de Anemia Infecciosa Equina (AIE) certificado por Agrocalidad (Ecuador), y su calendario sanitario, principalmente es basado en una aplicación de complejos vitamínicos mensual y una desparasitación trimestral. Los caballos tienen un sistema de manejo semi-intensivo que incluye semanalmente, pastorear en un potrero a campo abierto durante el día y confinarlos durante las noches en sus pesebreras (4 m [largo] x 4 m [ancho]). Además, dentro de su comportamiento físico, los caballos son sometidos a un entrenamiento físico (trote) de 45 minutos tres veces por semana.

Previo al Experimento 1, los caballos fueron entrenados para el salto mediante el uso de una yegua en celo. En ambos experimentos (1 y 2), el proceso de recolección de semen se realizó semanalmente usando una vagina artificial (VA) tipo Hannover. La VA fue armada, lubricada y acondicionada a una temperatura entre 45 y 50°C. El tubo de recolección fue dotado de un filtro para retener la fracción gelatinosa pobre en espermatozoides. Previo a la colecta se realizó un lavado del pene con suero fisiológico precalentado a 37°C para limpiar el esmegma. Inmediatamente después de la recolección, cada eyaculado fue pre-diluido en una fracción 1:1 con cada diluyente base. En ambos experimentos, la pre-dilución 1:1 se realizó en dos fracciones de 10-20 mL con UHT-R e INRA-96 previamente temperados a 37°C. Inmediatamente las muestras fueron transportadas a 37°C hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal para su análisis inicial y procesamiento según sea cada experimento.

4.3.2 Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de *L-carnitina*

En el laboratorio, el primer análisis consistió en la determinación de la concentración usando la cámara de Neubauer. Para este propósito, se usó una dilución 1:200, mezclando 3 μ L semen crudo (sin diluir) con 600 μ L de solución formolada (5%, v/v). De esa mezcla se tomó 10 μ L y se colocó en la cámara de Neubauer recubierta por un cubreobjetos y se contó los espermatozoides mantenidos dentro de los 5 cuadrantes, usando un microscopio de campo claro 40 X de

magnificación. El total de espermatozoides contados se multiplicó por 10^7 (constante) y el valor obtenido fue expresado en millones (Galarza et al., 2018) (Figura 3).

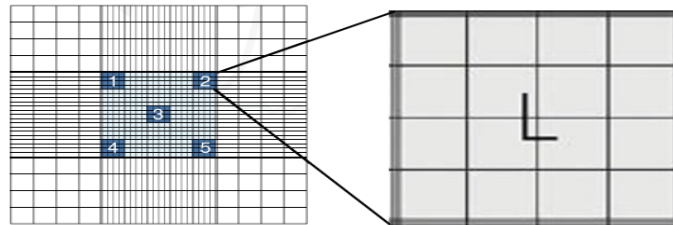


Fig 6. Lectura en la cámara de Neubauer de los espermatozoides (Montoya, 2009)

Cada fracción de muestra prediluida 1:1 de cada diluyente, fue diluida con las diferentes concentraciones crecientes de LC ajustadas a una concentración final de 30×10^6 espermatozoides/mL. El Experimento 1 incluyó 12 tratamientos que se detallan a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. Tratamientos del Experimento 1

Diluyente base	Control	Concentración de <i>L-carnitina</i>				
	0 mM	1 mM	5 mM	10 mM	25 mM	50 mM
UHT-R	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM
INRA-96®	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM

Todas las muestras (equivalentes a los tratamientos) de ambos diluyentes fueron almacenados en refrigeración (5 °C) durante 96 horas. Las evaluaciones de la cinética espermática e integridad de membranas plasmáticas y acrosomales fueron realizadas inicialmente (0 horas) y 48 y 96 h de almacenamiento.

4.3.3 Experimento 2. Efecto de la *L-carnitina* en semen equino criopreservado

Este experimento se realizó con la concentración más idónea de *L-carnitina* determinada en el Experimento 1 (25 mM) con la finalidad de evaluar el efecto de este



aditivo en muestras seminales agrupadas ya sea refrigeradas – calentadas o congeladas – descongeladas. Este experimento fue diseñado para trabajar con muestras grupadas (pools) para controlar el factor de variabilidad individual entre los reproductores.

El semen fue recolectado mediante una vagina artificial, pre-diluido inicialmente (1:1) con ambos diluyentes base (UHT-R e INRA-96) y transportado al laboratorio en un tiempo menor a 2 horas. En el Laboratorio se determinó la concentración espermática de cada eyaculado y entonces se conformaron las agrupaciones (pools). Cada pool fue conformado por la unión dos eyaculados (pre-diluidos) asignados al azar por cada diluyente en estudio. Por ejemplo, el Pool 1 resultó de la agrupación simultánea de los eyaculados proveniente de los reproductores 1 y 2, pre-diluidos tanto con UHT como con INRA-96. Cada pool de cada diluyente fue dividido en dos grandes alícuotas que fueron usadas cada una para la refrigeración y congelación del semen, respectivamente. En la Tabla 7 se detallan los tratamientos obtenidos para la refrigeración y congelación

Tabla 7. Tratamientos del Experimento 2

Diluyente base	Control (0 mM LC)	L-carnitina 25 mM
<i>Para refrigeración</i>		
UHT (n = 96)	UHT-Co	UHT-LC25
INRA-96 (n = 96)	INRA-Co	INRA-LC25
<i>Para congelación</i>		
UHT + 5% (v/v) de glicerol (n = 96)	UHT-Co	UHT-LC25
INRA-Freeze (n = 96)	INRA-Co	INRA-LC25

4.3.3.1 Refrigeración del semen

La alícuota de refrigeración de cada pool fue diluida con UHT e INRA-96, suplementadas o no con 25 mM de L-carnitina a una concentración final de 200×10^6 espermatozoides /mL, de tal modo que se generó 4 tratamientos por cada pool: UHT



control (UHT-Co), UHT-L-carnitina (UHT-LC25), INRA-control (INRA-Co), e INRA-L-carnitina (INRA-LC25) (Tabla 7). Estas muestras fueron almacenadas a 5 °C durante 72 horas y evaluadas su cinética e integridad de las membranas espermáticas a las 0, 24 y 72 horas.

4.3.3.2 Congelación del semen

Asimismo, cada alícuota de congelación de cada pool fue diluida con los diluyentes UHT e INRA-Freeze suplementadas o no con *L-carnitina* a una concentración de 30×10^6 espermatozoides /mL. En las muestras diluidas con UHT se suplementó con glicerol a una concentración final de 5% (v/v). Al igual que las muestras refrigeradas, se generó también cuatro tratamientos por cada pool: UHT control (UHT-Co), UHT-L-carnitina (UHT-LC25), INRA-C-Freeze (INRA-Co), INRA-C-L-carnitina (INRA-LC25). Las muestras fueron mantenidas durante 75 minutos a 5°C para su equilibrio y entonces las muestras fueron cargadas en pajuelas de 0,25 ml y selladas con alcohol de polivinilo.

El proceso de congelación se realizó mediante la exposición de las pajuelas a vapores de NL_2 estático contenido en un cryo-box (caja de poliestireno de 29 x 31 x 30 cm de largo, ancho y alto, respectivamente). El volumen de NL_2 contenido en la caja fue de 3,4 L que coincidió a una distancia de 4 cm del fondo; el NL_2 fue aplicado 30 minutos antes de la congelación para lograr el equilibrio y estabilidad de los vapores de NL_2 . Brevemente, las pajuelas fueron colocadas en la rampa superior ubicada a una altura de 17 cm del nivel de NL_2 y se mantuvo durante 4 minutos; por consiguiente, las pajuelas fueron bajadas a la rampa inferior que se encontró a 7 cm del nivel de NL_2 y se mantuvo también durante 2 minutos. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el NL_2 y se almacenaron a -196 °C hasta su descongelación y análisis posterior.

Durante el proceso de congelación se determinó el momento exacto de la nucleación de hielo y la disipación del calor latente de fusión, usando un termómetro digital "Temocuople Digital thermometer® (Ref 6802 II) y termopar (sensor de temperatura) de alambre fino Tipo K. Este termopar fue introducido dentro de una



pajuela de 0,25 ml, ficticia, con medio de congelación durante el protocolo de congelación para registrar la temperatura interna (T_{in}) durante el enfriamiento. Para introducir el sensor térmico se hizo cuidadosamente un orificio usando la punta de una aguja y entonces el orificio fue sellado usando parafilm. La pajuela fue colocada en las rampas de congelación y se congeló siguiendo los procedimientos detallados anteriormente. Al iniciar la congelación, la temperatura inicial fue de 5°C (denominada tiempo "cero") y desde entonces se registró el descenso de la temperatura por unidad de tiempo (por cada segundo hasta el final de la congelación). Durante el rango crítico de temperatura (-5°C a -25°C) se registró el momento exacto de la nucleación de hielo y de la disipación del calor latente de fusión. Para esta determinación, se registró el segundo exacto cuando sucedió un ascenso de temperatura (equivalente a la nucleación de hielo o "seeding") y se calculó la duración de la posterior disipación del calor latente de fusión (tiempo en retornar a la temperatura de descenso).

La descongelación de las pajuelas fue realizada sumergiéndolas en agua atemperada a 37 °C en un baño María durante 30 segundos. Las muestras congeladas – descongeladas fueron evaluadas su cinética e integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

4.4 Análisis de calidad espermática

4.4.1 Cinética espermática

Las características cinéticas de todas las muestras frescas – diluidas, refrigeradas – calentadas y congeladas – descongeladas, y suplementadas o no (controles) con *L-carnitina* fueron analizadas objetivamente usando un sistema computarizado CASA, SCA-Evolution® (*Sperm Class Analyzer, SCA - 2018, versión 6.4.0.99; software, Microptic S.I., Barcelona, Spain*) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases, siguiendo los procedimientos descrito por Galarza et al. (2018). El sistema evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10X de magnificación usando una velocidad de adquisición de imagen de 25 cuadros. Para la evaluación se tomó 5 μ L de cada muestra espermática a analizar ajustada a una concentración de 15×10^6



espermatozoides/mL usando el mismo diluyente (recomendable) y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinéticas registradas fueron: porcentaje de motilidad total (MT, %), porcentaje de motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz)

4.4.2 Integridad de membranas espermáticas

Asimismo, el estado de las membranas plasmáticas y acrosomal de los espermatozoides de todas las muestras frescas – diluidas, refrigeradas – calentadas y congeladas – descongeladas, y suplementadas o no (controles) con *L-carnitina* fueron analizadas mediante microscopía de epifluorescencia usando la prueba de doble tinción de fluorescencia simultánea PI (yoduro de propidio) / PNA-FITC (*aglutinina*). Para lograr este propósito, las muestras espermáticas fueron diluidas 250 μL en el medio tampón HEPES (atemperado a 22 °C) ajustadas a una concentración final de 10×10^6 espermatozoides/mL. Previamente, las alícuotas de yoduro de propidio y aglutinina fueron descongeladas, y en condiciones de oscuridad fueron mezcladas en la misma cantidad (100 μL PI + 100 μL de PNA-FITC). Esta mezcla de fluorocromos (stock) fue mantenida a temperatura ambiente (22 °C). Sin luz, se agregó 5 μL del stock de fluorescencia a las muestras mantenidas en HEPES. Las muestras fueron ligeramente homogenizadas y colocadas en un porta y cubreobjetos para ser evaluadas en el microscopio de fluorescencia según lo detallado por Galarza et al. (2018). La integridad de la membrana plasmática (equivalente a la viabilidad o vivos) y el estado de la membrana acrosómica fueron evaluadas simultáneamente mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.) contando un total de 200 espermatozoides y categorizándoles en las siguientes subpoblaciones: espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA,%), espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA,%);



espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA,%); y finalmente espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA,%). Además, con estas subpoblaciones fueron calculadas los valores totales correspondientes a la integridad de la membrana plasmática (IMP, % = IPIA + IPDA) y acrosomal (IMA, % = IPIA + DPIA).

4.5. Análisis estadísticos

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente analizados estadísticamente en un software para Windows STATISTICA, *version 12.0* (StatSoft, Tulsa, OK, EE. UU.). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos. Los variables porcentuales y numéricas que no cumplieron una distribución normal fueron convertidas al *Arcoseno* y *Log-10* respectivamente, previo a los análisis estadísticos. El análisis estadístico incluyó un modelo lineal general (GLM) para demostrar el efecto de la *L-carnitina* suplementada a ambos diluyentes en estudio bajo antes y después de la criopreservación (refrigeración y congelación).

En el Experimento 1 y en el análisis de las muestras refrigeradas del Experimento 2, se usó un ANOVA de medidas repetidas y la prueba post-Hoc de comparación múltiple de Bonferroni considerando los siguientes factores independientes: la dosis de *L-carnitina*, el diluyente y su interacción frente al factor tiempo refrigeración. Adicionalmente, el factor individual “reproductor” como covariable fue incluido en el análisis del Experimento 1, debido a la variabilidad entre algunos caballos. En el análisis de las muestras congeladas – descongeladas, se usó un ANOVA unidireccional y la prueba Post-Hoc de Bonferroni para evaluar el efecto de la *L-carnitina* en los diluyentes estudiados. Los valores se expresaron en media \pm SEM (error estándar de la media). El nivel de significación fue considerado cuando el valor de $P < 0,05$.



5. RESULTADOS

5.1. Análisis de determinación de concentración óptima de *L-carnitina* (Obj. 1)

Los valores promedios (\pm EEM) y el nivel de significancia de factores: dosis de *L-carnitina*, tipo de diluyente, y su interacción con el factor tiempo, resultante del análisis de los parámetros cinéticos e integridad de las membranas espermáticas (plasmalema y acrosoma) de las muestras frescas – diluidas con INRA o UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM y refrigeradas (48 y 96 h) se muestran en el Anexo 1–3.

5.1.1. Análisis de los parámetros cinéticos

En general, todos los parámetros cinéticos y de integridad de las membranas espermáticas de las muestras frescas – diluidas (0 h) no difirieron significativamente ($P > 0,05$) entre tratamientos de LC ni en el diluyente INRA ni en el UHT, determinando de esta manera, que la suplementación de LC (1 a 50 mM) no mejoró la calidad espermática en muestras frescas – diluidas. Sin embargo, el efecto estimulador de la locomoción y protector de las membranas espermáticas si fueron evidenciados bajo condiciones de refrigeración (5 °C) a mediano (48 h) y largo (96 h) plazo.

En el análisis de MT (Motilidad Total), las muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 48 h, se registraron porcentajes más altos ($P < 0,01$) en los grupos LC-25mM y LC-5mM en comparación con los grupos LC-1mM, LC-50mM y el control. En muestras diluidas con UHT a las mismas 48 h, los valores más altos fueron con los grupos de LC-1mM a LC-25mM comparados con su contraparte control. Además, en muestras refrigeradas durante 96 h y diluidas con INRA se obtuvo una MT más alta con LC-25mM comparado con los tratamientos: LC-1mM, LC-10mM, LC-50mM y control. En el análisis del factor tiempo, todos los grupos LC diluidos tanto con INRA y UHT disminuyeron su MT a las 48 ($P < 0,01$) y 96 h ($P < 0,001$). Sin embargo, los grupos LC-25mM diluido con INRA y LC-10mM diluido con UHT registraron una disminución significativa ($P < 0,001$) sólo a las 96 h (Fig 7).

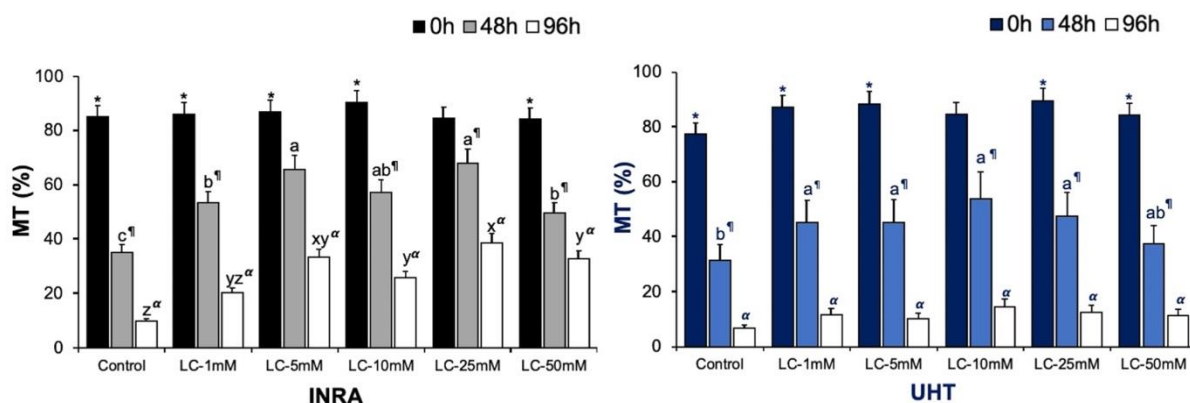


Fig 7. Motilidad total (MT) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de *L-carnitina*, y refrigeradas durante 48 y 96 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 48$ h; † $P < 0,001 = 48 - 96$ h; α $P < 0,001 = 0 - 96$ h). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h (^{a-b-c} $P < 0,05$, ^{a-c} $P < 0,01$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h (^{x-y-z} $P < 0,05$, ^{x-z} $P < 0,01$).

En el análisis de MP, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 48 h se registraron porcentajes más altos en los tratamientos LC-25mM y LC-5mM comparado con los tratamientos LC-50mM ($P < 0,05$) y control ($P < 0,01$); mientras que, en las muestras diluidas con UHT a las mismas 48 h de refrigeración, se registraron valores superiores ($P < 0,01$) de MP con todos los grupos LC en comparación con su control. De la misma manera, solo en las muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 96 h se produjeron una MP más alta ($P < 0,01$) con todos los grupos LC comparado con control. En el análisis del factor tiempo, hubo una reducción significativa ($P < 0,001$) del porcentaje de MP en todos los grupos LC de ambos diluyentes. Un hallazgo importante fue registrado en el grupo LC-50mM del diluyente INRA indicando que, a pesar de sus valores bajos, la MP se mantuvo (no varió, $P > 0,05$) en las muestras refrigeradas durante las 96 h en comparación con aquellas muestras refrigeradas durante 48 horas (Fig 8).

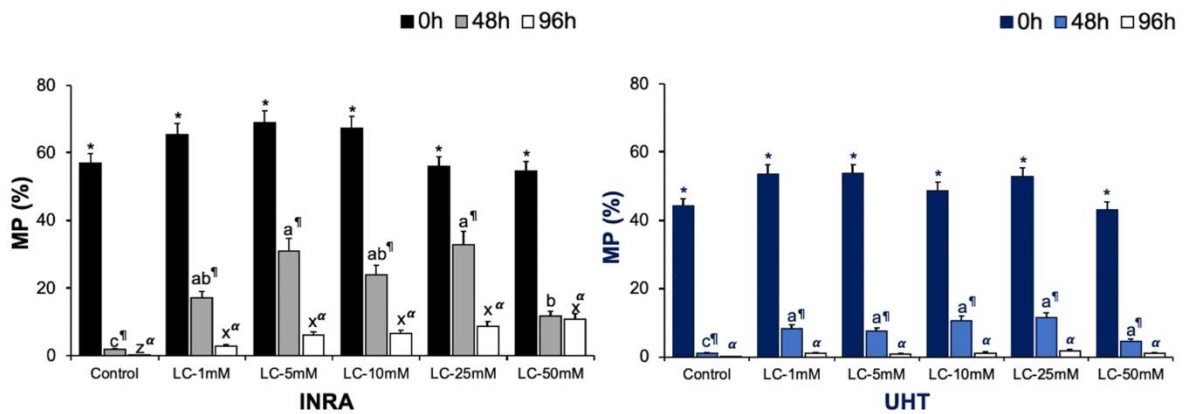


Fig 8. Motilidad progresiva (MP %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. * - [¶] - ^α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* P<0,01 = 0 - 48 h; [¶] P<0,001 = 48 - 96 h; ^α P<0,001 = 0 - 96 h). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h (^{a-b-c} P<0,05, ^{a-c} P<0,01). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h (^{x-z} P<0,01).

En el análisis de VCL, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 48 h, se evidenció valores más altos (P<0,01) en todos los grupos LC en comparación el control; y en muestras diluidas con UHT a las mismas 48 h, los valores más altos (P<0,01) fueron registrados en los grupos LC-10mM y LC-25mM comparados con LC-5mM, LC-50mM y su control. En el análisis de muestras diluidas con INRA y refrigeradas 96 h, se registraron valores más altos con LC-25mM y LC-50mM comparado con LC-5mM (P<0,05) y control (P<0,01); mientras que, en muestras diluidas con UHT a las mismas 96 h, la VCL más superior (P<0,05) con todos los grupos LC en comparación con el control. En el análisis del factor tiempo, eficientemente todos los grupos de LC diluidos con INRA no disminuyeron (P>0,05) la VCL en todo el tiempo de refrigeración; en contraste, su grupo control disminuyó significativamente su valor a partir de las 48 h. Del mismo modo, los grupos LC diluidos con UHT en dosis de 1 a 25mM registraron una reducción de la VCL a las 96 h, mientras que el grupo control y LC-50mM registraron una reducción de la VCL a partir de las 48 h (Fig 9).

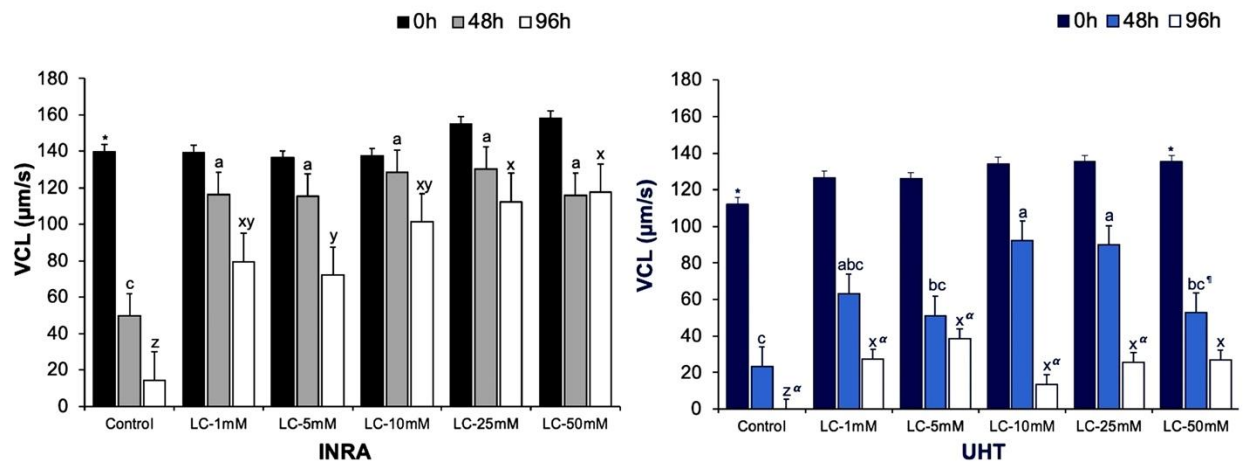


Fig 9. Velocidad Curvilínea. (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas del tiempo de refrigeración en cada tratamiento y diluyente (* $P < 0,01 = 0 - 48$ h; † $P < 0,001 = 48 - 96$ h; α $P < 0,001 = 0 - 96$ h). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 48 h (^{a-b-c} $P < 0,05$, ^{a-c} $P < 0,01$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h (^{x-y-z} $P < 0,05$; ^{x-z} $P < 0,01$).

En el análisis la VSL, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas 48 h se evidenciaron valores más altos ($P < 0,05$) en los grupos LC con dosis entre 5 a 25 mM comparado con su control; mientras que, en muestras diluidas con UHT a las mismas 48 h, los mejores valores de VSL fueron registrados ($P < 0,05$) en los grupos LC con dosis entre 1 a 25 mM comparados con su control. En el análisis de muestras refrigeradas durante 96 h y diluidas con tanto con INRA como con UHT, todos los grupos de LC mejoraron ($P < 0,05$) la VSL en comparación con sus contrapartes controles. El análisis del factor tiempo, los grupos LC-1mM y LC-5mM diluidos con INRA disminuyeron ($P < 0,001$) la VSL a las 96 h de refrigeración. No obstante, todos los grupos de LC (incluido el control) diluidos con UHT redujeron ($P < 0,001$) la VSL a partir de las 48 h (Fig 10).

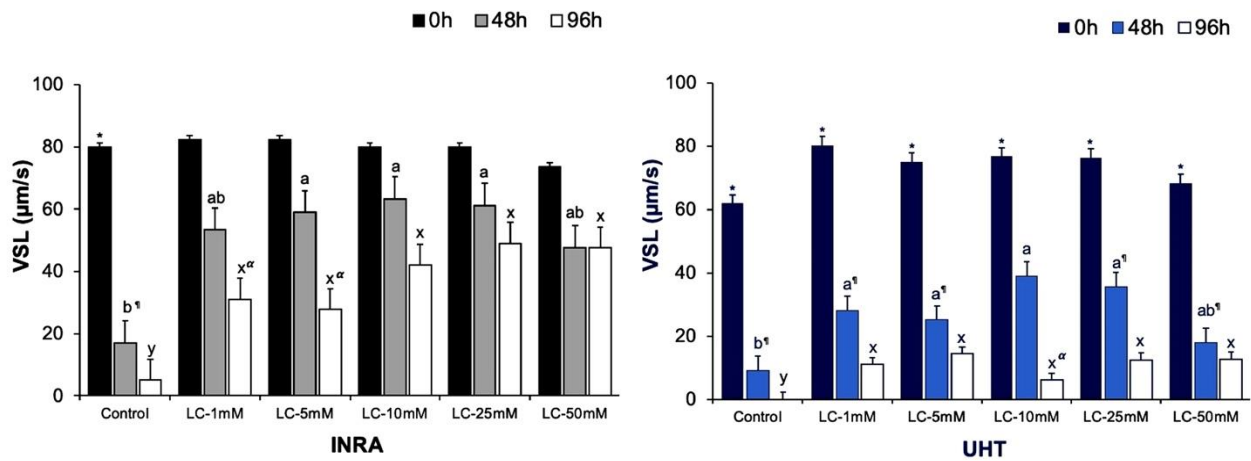


Fig 10. Velocidad rectilínea. (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. *¹-^α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas del tiempo de refrigeración en cada tratamiento y diluyente (* $P < 0,01 = 0 - 48 \text{ h}$; ¹ $P < 0,001 = 48 - 96 \text{ h}$; ^α $P < 0,001 = 0 - 96 \text{ h}$). ^{a-b} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 48 h ($P < 0,05$). ^{x-y} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 96 h ($P < 0,05$).

En el análisis de STR, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas 48 y 96 horas, se registraron porcentajes más altos ($P < 0,05$) de STR en los grupos LC con dosis de '10 y 25 mM', y con '25 y 50 mM', respectivamente, comparados con sus contrapartes controles. En el análisis del factor tiempo, eficientemente ningún grupo de LC diluido con INRA disminuyeron ($P > 0,05$) los porcentajes de STR durante todo el tiempo de refrigeración. Sin embargo, todos los grupos diluidos con UHT disminuyeron ($P > 0,001$) el STR las 96 h de refrigeración (Fig 11).

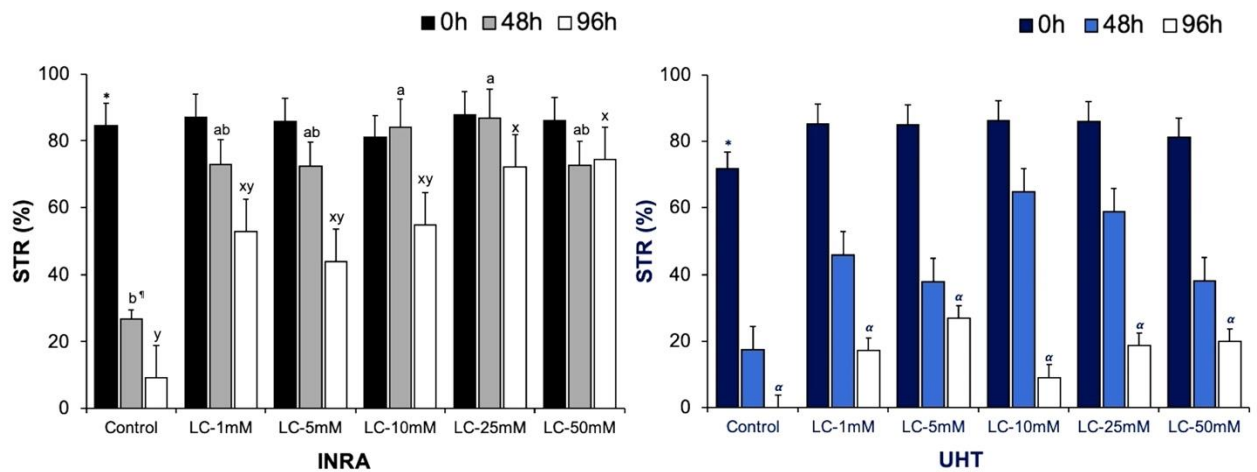


Fig 11. Rectitud (STR, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas del tiempo de refrigeración en cada tratamiento y diluyente (* P<0,01 = 0 - 48 h; † P<0,001 = 48 - 96 h; α P<0,001 = 0 - 96 h). ^{a-b} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 48 h (P<0,05). ^{x-y} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 96 h (P<0,05).

En el análisis de LIN, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 48 h se registró porcentajes más altos (P<0,05) en los grupos LC con dosis de 5 a 25 mM comparados con su control. En el análisis del factor tiempo, los grupos LC con dosis de 10 a 50 mM y diluidos con INRA, eficientemente no disminuyeron (P>0,05) la LIN durante todo el tiempo de refrigeración. Por otro lado, los grupos LC-1mM, LC-5mM y LC-50mM y diluidos con UHT redujeron (P<0,001) sus porcentajes de LIN a partir de las 48 h; mientras que los grupos LC-10mM y LC-25mM diluidos también con UHT redujeron (P<0,001) sus porcentajes de LIN más tarde a las 96 h (Fig 12).

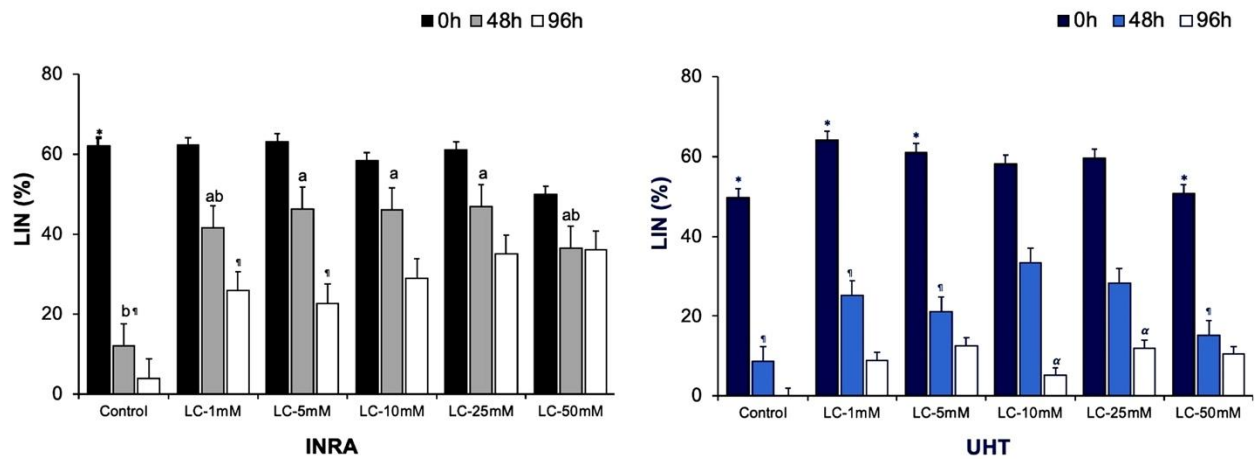


Fig 12. Linealidad (LIN, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h. * - ¶ - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas del tiempo de refrigeración en cada tratamiento y diluyente (* P<0,01 = 0 - 48 h; ¶ P<0,001 = 48 - 96 h; α P<0,001 = 0 - 96 h). ^{a-b} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 48 h (P<0,05).

En el análisis de ALH, las muestras diluidas con INRA y refrigeradas 96 h, se registró un valor más alto (P<0,05) en el grupo LC-50mM comparados con su control. En el análisis del factor tiempo, ningún grupo de LC diluido con INRA disminuyeron (P>0,05) sus valores de ALH durante todo el tiempo de refrigeración. Asimismo, los grupos LC-1mM y LC-5mM diluidos con UHT tampoco redujeron (P>0,05) sus valores de ALH durante todo el tiempo de refrigeración; mientras que el resto de grupos (LC-10mM, LC-25mM, LC-50mM y control) si mostraron una reducción significativa (P<0,001) de ALH a las 96 h de refrigeración (Fig 13).

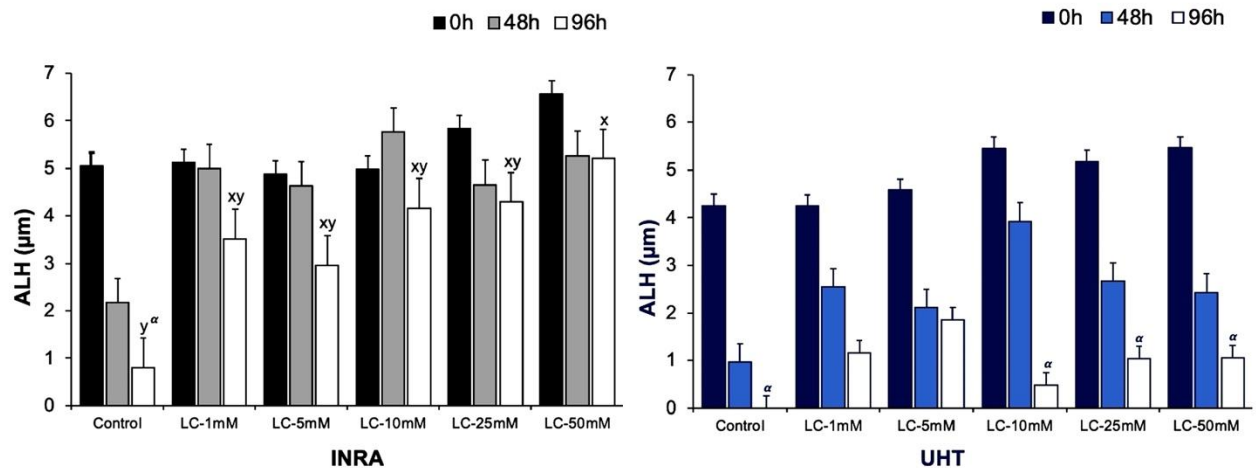


Fig 13. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) de muestras espermáticas de caballo diluidas en INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h. α Presencia de símbolo expresan diferencias significativas entre 0 y 96 h refrigeración en cada tratamiento y diluyente ($P < 0,001$). $x-y$ Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 96 h ($P < 0,05$).

Al igual que ALH, en el análisis de BCF, solamente se evidenció diferencias significativas en muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 96 h, registrando un valor más alto ($P < 0,05$) en el grupo LC-25mM comparados con su control. En el análisis del factor tiempo, eficientemente ningún grupo de LC diluido con INRA o con UHT disminuyeron ($P > 0,05$) sus valores de BCF durante todo el tiempo de refrigeración. En contraste, los grupos controles de ambos diluyentes evidenciaron una reducción ($P < 0,001$) de BCF a las 96 h de refrigeración (Fig 14).

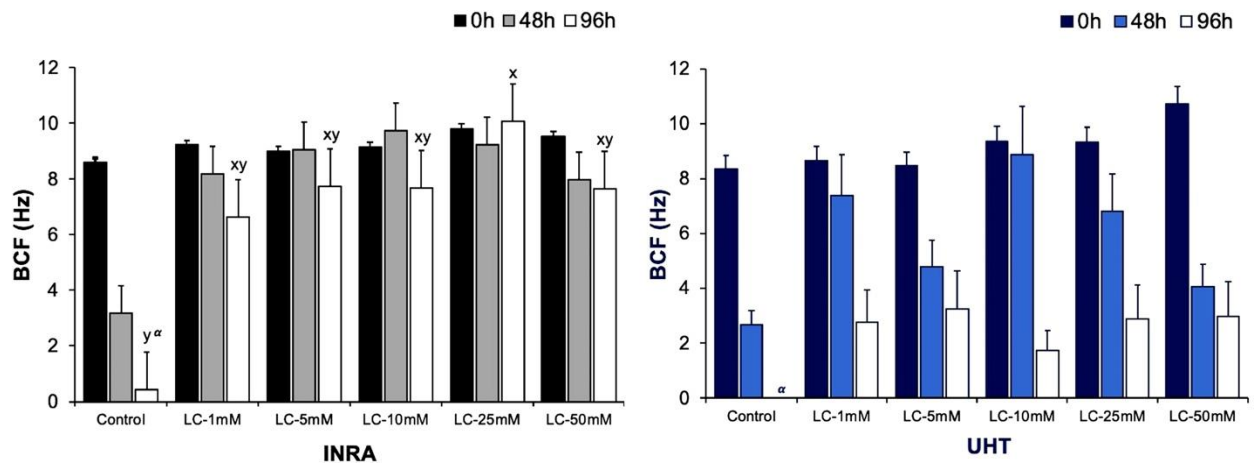


Fig 14. Frecuencia de batida del flagelo (BCF, μm) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas (5°C) durante 48 y 96 h. α Presencia de símbolo expresan diferencias significativas entre 0 y 96 h refrigeración en cada tratamiento y diluyente ($P < 0,001$). $x-y$ Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras refrigeradas durante 96 h ($P < 0,05$).

5.1.2. Análisis de la integridad de las membranas espermáticas

El análisis simultáneo de la integridad de las membranas espermáticas demostró una interacción entre los factores “dosis de *L-carnitina*” y “diluyente” en las subcategorías IPIA ($P = 0,0198$) e IPDA ($P = 0,0280$), y en la integridad de membrana plasmática (IMP, equivalente a viabilidad, $P = 0,0000$) (Ver Anexo 3).

Las muestras diluidas tanto con INRA como con UHT y refrigeradas durante 48 h, todos los grupos de LC mejoraron ($P < 0,01$) los porcentajes de IPIA y IMP comparados con sus contrapartes controles. Con la misma tendencia, en muestras diluidas con INRA y refrigeradas durante 96 h se registraron porcentajes más altos ($P < 0,01$) de IPIA e IMP en los grupos de LC con dosis de 10 a 50 mM, en comparación con el grupo LC-1mM y su control. En el análisis de factor tiempo, todos los grupos de LC de ambos diluyentes (incluyendo sus controles) mostraron una reducción significativa ($P < 0,001$) de ambos porcentajes IPIA e IMP a partir de las 48 h y 96 h de refrigeración. De esta manera, se demuestra que a pesar de que la LC muestra un efecto protector de la membrana plasmática, la integridad disminuye según el tiempo de refrigeración incrementa (Fig 15-16).

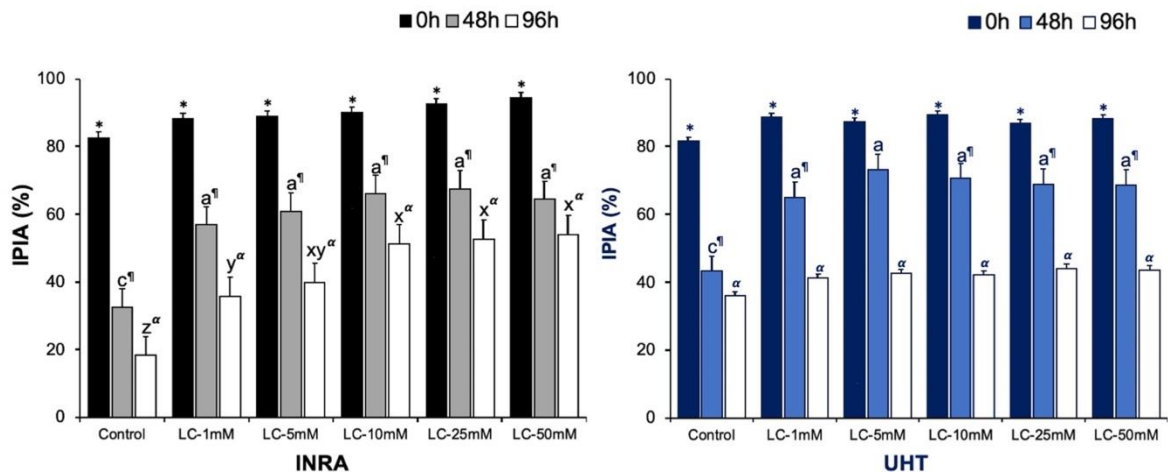


Fig 15. Espermatozoides con membrana plasmática íntegra y acrosoma íntegro simultáneo (IPIA, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 48$ h; † $P < 0,001 = 48 - 96$ h; α $P < 0,001 = 0 - 96$ h). a-c Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h ($P < 0,01$). x-z Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h ($x-y-z P < 0,05$; $x-z P < 0,01$).

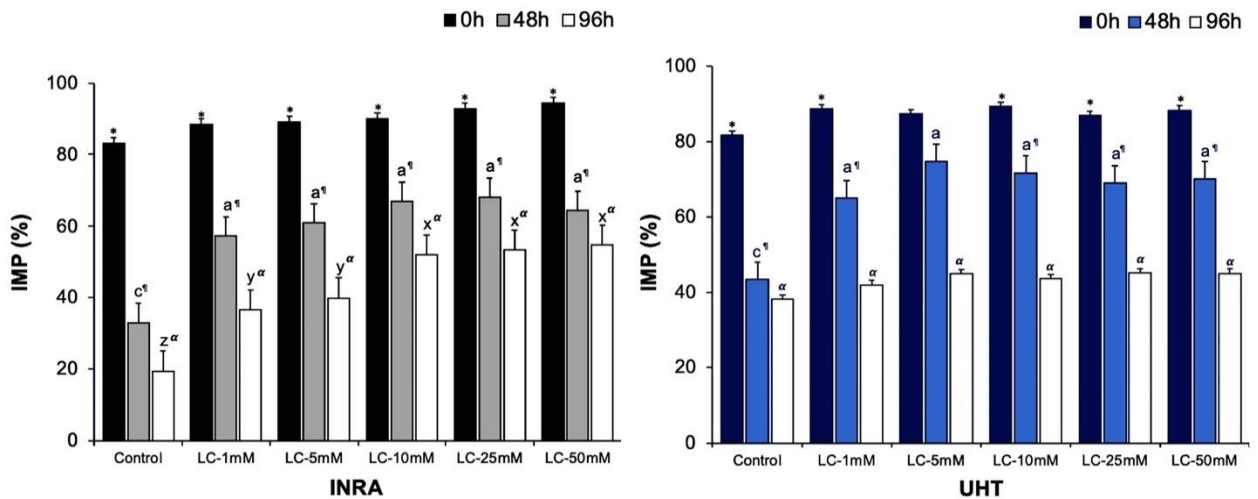


Fig 16. Integridad de membrana plasmática o viabilidad (IMP, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA-96 y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 48$ h; † $P < 0,001 = 48 - 96$ h; α $P < 0,001 = 0 - 96$ h). a-c Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h ($P < 0,01$). x-z Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h ($x-y-z P < 0,05$; $x-z P < 0,01$).

Finalmente, el análisis de la IMA no evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) entre muestras grupos de LC (y controles) en muestras diluidas ya sea con INRA o UHT y analizadas frescas o después de 48 o 96 horas de refrigeración. Solamente, el tiempo de refrigeración afectó drásticamente a las muestras espermáticas diluidas con UHT y suplementadas con 1, 10, 25 y 50 mM de LC cuando se registró una reducción ($P < 0,001$) de los porcentajes de IMA a las 96 h (Fig 17).

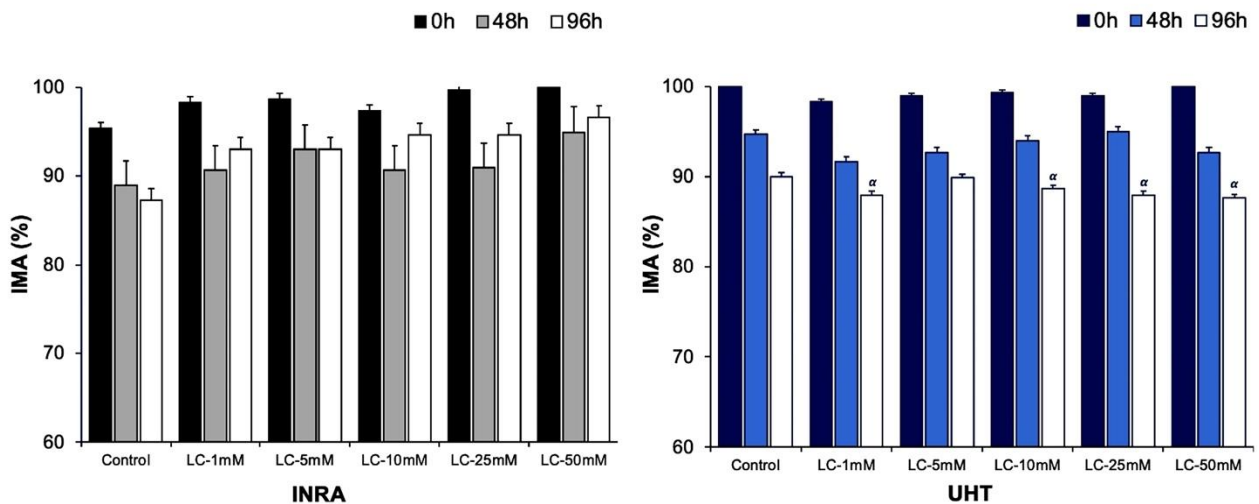


Fig 17. Integridad de membrana acrosomal (IMA, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 0 (control), 1, 5, 10, 25 y 50 mM de LC, y refrigeradas durante 48 y 96 h. ^α Presencia de símbolo expresan diferencias significativas entre 0 y 96 h refrigeración en cada tratamiento y diluyente ($P < 0,001$).

5.2. Efecto de la LC en semen equino criopreservado (Obj. 2)

Los valores promedios (\pm EEM) y el nivel de significancia de todos los parámetros cinéticos e integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosomal de las muestras frescas (0 horas) y refrigeradas durante 48 y 96 horas usando los diluyentes INRA y UHT, suplementadas o no con 25mM de LC se muestran en el Anexo 4 – 6.

5.2.1. Efecto de la *L-carnitina* en espermatozoides refrigerados

Los análisis de la cinética espermática y la integridad simultánea de las membranas espermáticas demostraron una interacción significativa ($P < 0,05$) entre los factores “tiempo x diluyente” en todos los parámetros evaluados, a excepción de LIN



y WOB (Ver Anexo 4 – 5). Sin embargo, no se evidenciaron interacciones ($P > 0,05$) entre “*tiempo X L-carnitina*” ni “*tiempo X L-carnitina X diluyente*”.

5.2.1.1. Análisis de los parámetros cinéticos

En general, las muestras diluidas con INRA produjeron una mejor cinética en comparación con las muestras diluidas con UHT, independientemente de la suplementación de *L-carnitina* y del tiempo de almacenamiento en refrigeración.

La MT evaluada a las 0 h no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$), sin embargo, a las 48 h de refrigeración se evidenció porcentajes altos en muestras diluidas con INRA-LC25 en comparación con aquellas muestras diluidas con UHT-Co ($P < 0,01$) y UHT-LC25 ($P < 0,05$). Asimismo, a las 96 h, la MT fue superior en las muestras diluidas con INRA que, con UHT, independientemente de la adición o no de *L-carnitina*. En el análisis del factor tiempo, las muestras diluidas con INRA-Co, INRA-LC25 y UHT-LC25 redujeron ($P < 0,001$) la MT a las 72 h de refrigeración; solamente las muestras diluidas con UHT-Co redujeron ($P < 0,01$) la MT a las 24 h de refrigeración. La MP evaluada a las 0 h mostró porcentajes altos ($P < 0,05$) en muestras diluidas con INRA-LC25 en comparación con muestras diluidas con ambos UHT-Co y UHT-LC25. Asimismo, a las 24 y 96 h de refrigeración, la MP fue superior ($P < 0,01$) en las muestras diluidas con INRA que, con UHT, independientemente de la adición o no de *L-carnitina*. Al analizar el factor tiempo, la MP se redujo únicamente en las muestras diluidas con UHT-Co y UHT-LC a las 24 y 72 h de refrigeración, respectivamente (Fig 18).

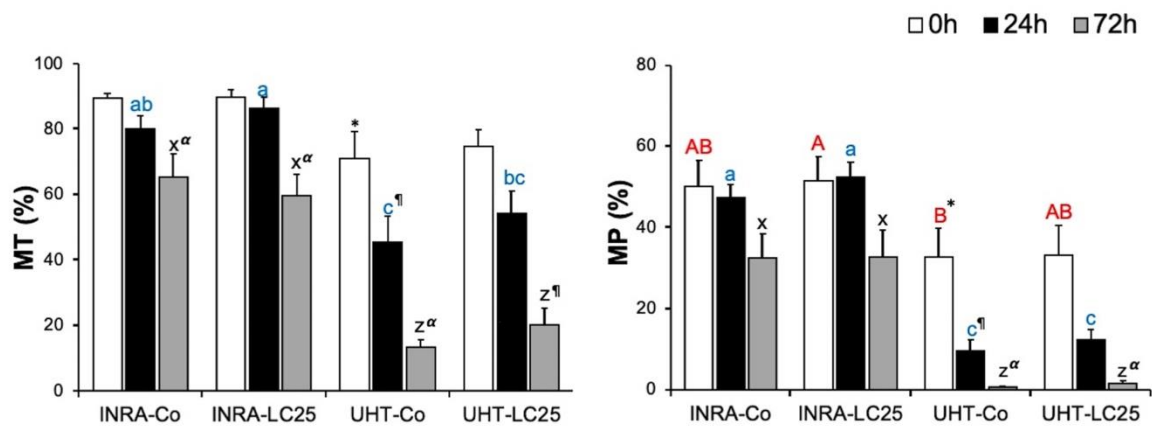


Fig 18. Motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - ¶ - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 24$ h; ¶ $P < 0,001 = 24 - 72$ h; α $P < 0,001 = 0 - 72$ h). A-B Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas (0 h) ($P < 0,05$). a-c Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 24 h ($a-b-c P < 0,05$, $a-c P < 0,01$). x-z Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 72 h ($x-y-z P < 0,05$, $x-z P < 0,01$).

El análisis de las velocidades (VCL, VAP y VSL) no evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos a las 0 h. Sin embargo, a las 24 y 72 h de refrigeración, la VCL, VAP y VSL fueron superiores ($P < 0,01$) en las muestras diluidas con INRA que, con UHT, independientemente de la adición o no de *L-carnitina*. Al analizar el factor tiempo, se mostró una reducción significativa de las tres velocidades únicamente en las muestras diluidas con UHT. Muestras diluidas con UHT-Co y UHT-LC25 redujeron su VCL y VAP a las 24 h y VSL a las 72 h de refrigeración (Fig 19).

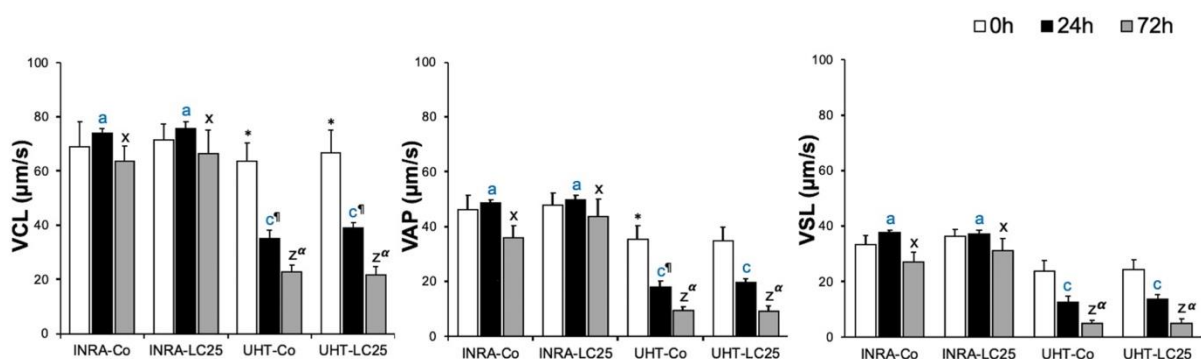


Fig 19. Velocidades curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - ¶ - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 24$ h; ¶ $P < 0,001 = 24 - 72$ h; α $P < 0,001 = 0 - 72$ h). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 24 h (^{a-b-c} $P < 0,05$, ^{a-c} $P < 0,01$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 72 h (^{x-y-z} $P < 0,05$, ^{x-z} $P < 0,01$).

El análisis de los parámetros de relación realizado a las 0 h, evidenció porcentajes más altos ($P < 0,05$) de STR y LIN en muestras diluidas con INRA-LC25 e INRA-Co en comparación con aquellas muestras diluidas con UHT-Co; mientras que el porcentaje de WOB fue mayor ($P < 0,05$) con ambos diluyentes INRA en comparación con ambos diluyentes UHT, independientemente de la adición o no de L-carnitina. Asimismo, a las 24 y 72 h de refrigeración, los porcentajes de STR, LIN y WOB fueron mayores ($P < 0,01$) en las muestras diluidas con INRA que, con UHT, independientemente de la adición o no de *L-carnitina*. Al analizar el factor tiempo, se evidenció una reducción significativa de los tres parámetros de relación solamente a las 72 h de refrigeración en los siguientes tratamientos: UHT-LC25 en STR; UHT-Co y UHT-LC25 en LIN; e INRA-Co, UHT-Co y UHT-LC25 en WOB (Fig 20).

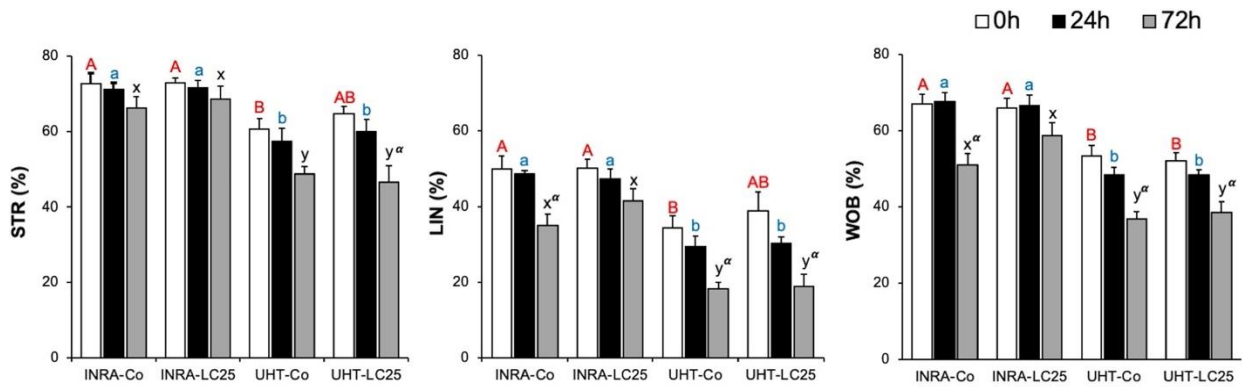


Fig 20. Parámetros de relación, STR (%), LIN (%) y WOB (%) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - ¶ - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* P<0,01 = 0 - 24 h; ¶ P<0,001 = 24 - 72 h; α P<0,001 = 0 - 72 h). ^{a-b} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 24 h (P<0,05). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 72 h (P<0,01).

La ALH mostró valores más altos (P<0,05) con INRA-Co comparado con UHT-Co y UHT-LC25, únicamente a las 24 h; mientras que la BCF fue superior en muestras diluidas con INRA en comparación con las diluidas con UHT, independientemente de la suplementación de L-carnitina, únicamente a las 96 h de refrigeración. Asimismo, se redujeron los valores de BCF a las 72 h de refrigeración únicamente en muestras diluidas con UHT-Co y UHT-LC25 (Fig 21).

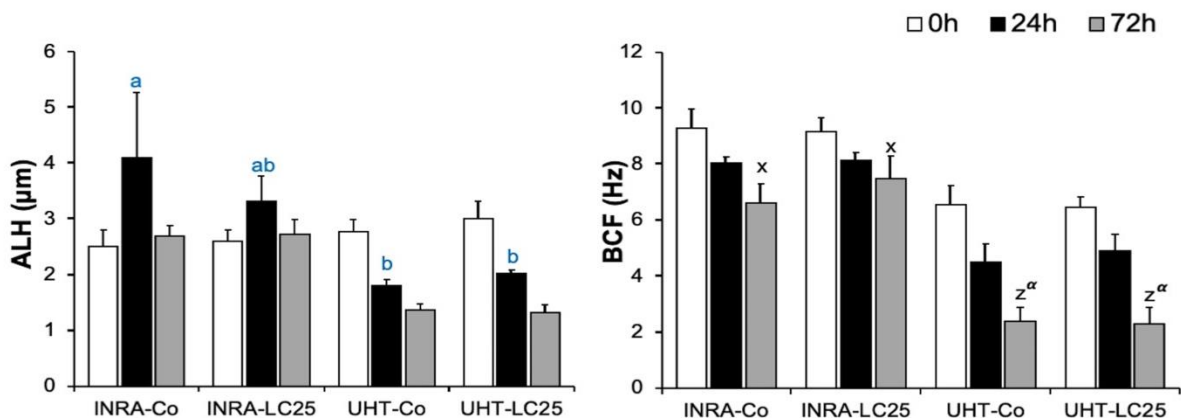




Fig 21. ALH y BCF de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - \dagger - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 24$ h; $\dagger P < 0,001 = 24 - 72$ h; $\alpha P < 0,001 = 0 - 72$ h). ^{a-b} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 24 h ($P < 0,05$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 72 h ($P < 0,01$).

5.2.1.2. Análisis de la integridad de las membranas espermáticas

En general, el análisis del estado de las membranas espermáticas varió según incrementó el tiempo de almacenamiento, reduciendo (IPDA) o incrementando (IPDA, DPIA, y DPDA) sus porcentajes a las 72 h de refrigeración.

La evaluación de muestras frescas (0 h), mostró porcentajes mayores de IPIA en muestras diluidas con INRA-LC25, UHT-LC25 comparadas con UHT-Co. A las 24 h de refrigeración, las muestras diluidas con INRA-LC25 mostró porcentajes más altos ($P < 0,05$) de IPIA que todos los tratamientos en estudio; sin embargo, resultados más bajos fueron obtenidos con UHT-Co. De igual manera, a las 72 h las muestras diluidas con INRA produjeron porcentajes más altos ($P < 0,01$) de IPIA que aquellas muestras diluidas con UHT, independientemente de la suplementación de L-carnitina. Los porcentajes indeseables de IPDA evidenciaron diferencias significativas únicamente a las 72 h de refrigeración, mostrando valores deseables más bajos ($P < 0,05$) en muestras diluidas con INRA-Co e INRA-LC25) comparadas con las muestras diluidas con UHT-Co. El análisis de DPIA indeseable evidenciaron un porcentaje más alto en muestras diluidas con UHT-Co comparado con los otros diluyentes, ya sea en muestras frescas (0 h) o refrigeradas durante 24 y 72 h. En el análisis del factor tiempo evidenció un incremento indeseable ($P < 0,01$) de los porcentajes de DPIA en muestras diluidas con UHT (Co y LC25) y DPDA en las muestras diluidas con todos los diluyentes (Fig 22).

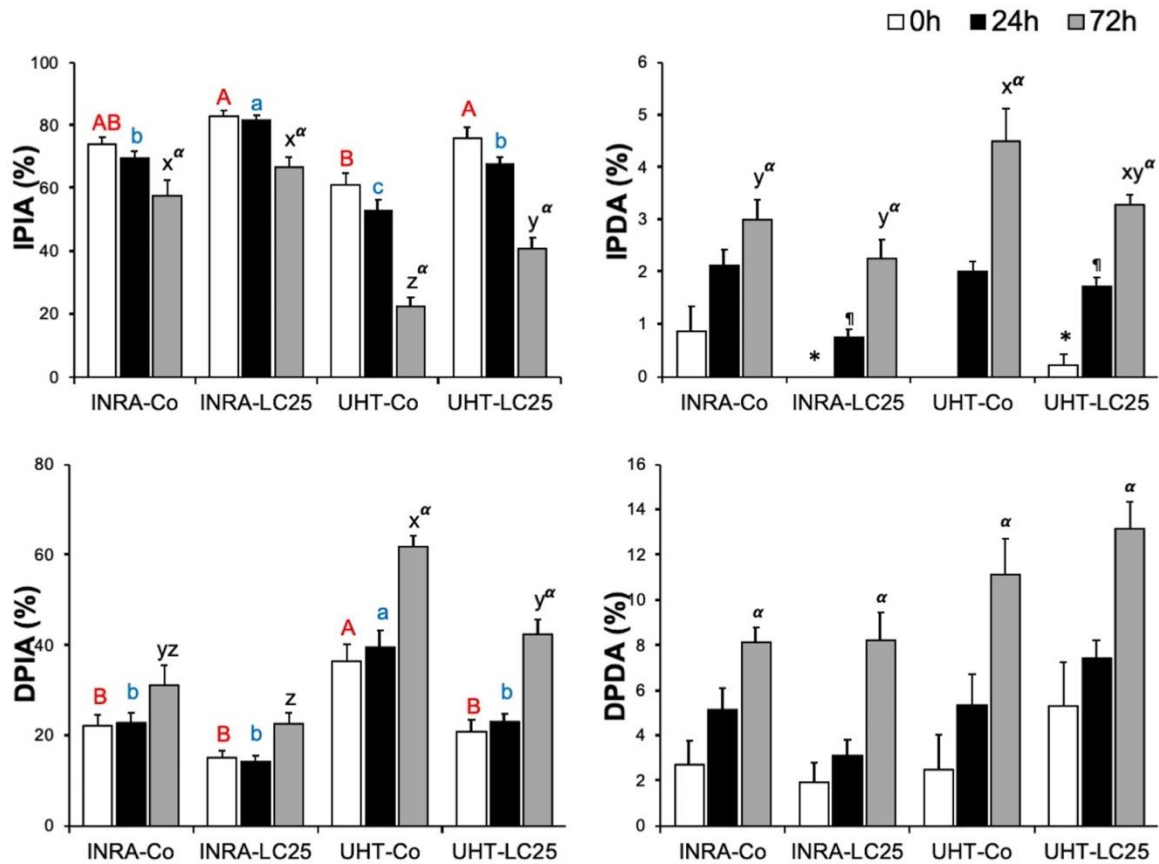


Fig 22. Subcategorías de fluorescencia de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de L-carnitina (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - † - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 24$ h; † $P < 0,001 = 24 - 72$ h; $\alpha P < 0,001 = 0 - 72$ h). ^{A-B} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas (0 h) ($P < 0,05$). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 24 h (^{a-b-c} $P < 0,05$, ^{a-c} $P < 0,01$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 72 h (^{x-y-z} $P < 0,05$, ^{x-z} $P < 0,01$).

El porcentaje de IMP en muestras frescas (0 h) fue mayor todos los tratamientos comparados con UHT-Co. Este análisis mostró que la integridad de la membrana plasmática mejoró ($P < 0,05$) después de suplementar el diluyente UHT con *L-carnitina*. A pesar de que los porcentajes de IMP fueron mejores con INRA, este efecto no fue evidenciado en este diluyente después de suplementarlo con *L-carnitina*. A las 24

horas de refrigeración, las muestras diluidas con INRA-LC25 fueron superiores ($P < 0,05$) que aquellas muestras diluidas con UHT (Co y LC25); y a las 72 h la IMP fue superior ($P < 0,05$) en las muestras diluidas con INRA que, con UHT, independientemente de la *L-carnitina* agregada (Fig 23).

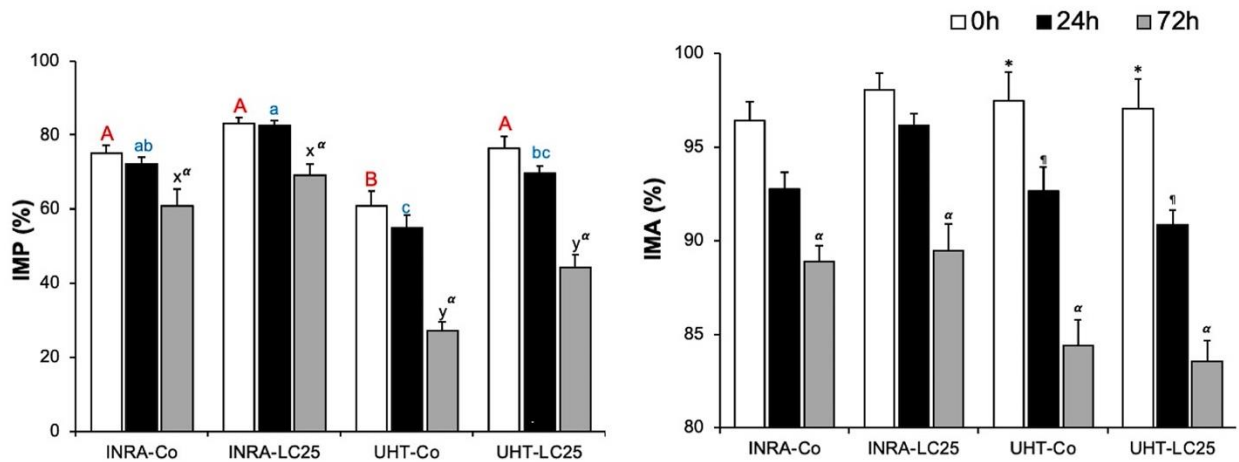


Fig 23. Integridad de membrana plasmática (IMP) y acrosomal (IMA) de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT, suplementadas con 25 mM de *L-carnitina* (LC25), y refrigeradas durante 24 y 72 h. * - ¶ - α Presencia de símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (* $P < 0,01 = 0 - 24$ h; ¶ $P < 0,001 = 24 - 72$ h; α $P < 0,001 = 0 - 72$ h). ^{A-B} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas (0 h) ($P < 0,05$). ^{a-c} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h (^{a-b-c} $P < 0,05$, ^{a-c} $P < 0,01$). ^{x-z} Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 96 h (^{x-y-z} $P < 0,05$, ^{x-z} $P < 0,01$).

5.2.2. Efecto de la *L-carnitina* en espermatozoides congelados – descongelados

Los valores promedio (\pm EEM) y el nivel de significancia de todos los parámetros cinéticos e integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosomal de las muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas usando los diluyentes INRA y UHT, suplementadas o no con 25mM de LC se muestran en el Anexo 7–8.

5.2.2.1. Evaluación de las rampas de congelación y velocidades de enfriamiento.

En la Figura 21 se muestra la curva de congelación generada con el protocolo de criopreservación que incluyo dos rampas de congelamiento mantenidas en un cryobox con vapores de NL_2 estático. La nucleación del hielo (*seeding*) se produjo en la primera rampa a una T_{in} registrada de $-8,5^{\circ}C$. El inicio de la nucleación del hielo ocurrió a 15 segundos de haber iniciado el protocolo de congelación y la duración aparente de la disipación del calor latente de fusión (definido como el tiempo entre la nucleación del hielo y el retorno al mismo T_{in}) terminó a los 41 segundos (tiempo total de calor latente de fusión: 26 s). Este protocolo de congelación en dos rampas de congelación produjo velocidades de enfriamiento por desaceleración: rampa 1 (17 cm del nivel del NL_2) que fue desde $+5^{\circ}C$ a $-74^{\circ}C$ a una velocidad promedio de $19^{\circ}C/min$; seguida de la rampa 2 (7 cm del nivel del NL_2) que fue desde $-74^{\circ}C$ a $-168^{\circ}C$ a una velocidad más rápida de $47^{\circ}C/min$. Finalmente, la evaluación de la T_{in} durante el rango crítico de temperatura ($-5^{\circ}C$ a $-10^{\circ}C$) donde ambos eventos ocurrieron (nucleación de hielo y el calor latente de fusión), el termocouple registró una velocidad promedio durante $9,17^{\circ}C/min$ (ver en el cuadro pequeño de la Fig 24).

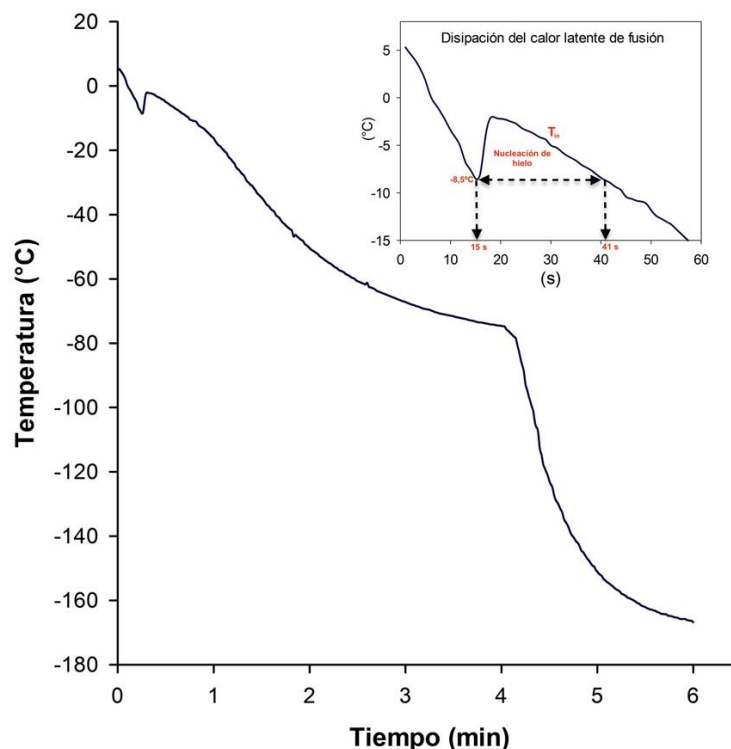


Fig 24. Evolución temporal de la temperatura medida en el interior de las pajuelas (T_{in}) en el protocolo de congelación de dos rampas de congelamiento mantenida dentro de



un cryo-box y vapores de NL_2 estático. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajillas se muestran en el recuadro pequeño.

5.2.2.2. Parámetros cinéticos

En general, todos los parámetros cinéticos de las muestras congeladas con el diluyente UHT con (UHT-LC25) o sin (UHT-Co) LC fueron afectados drásticamente ($P < 0,0001$) por el proceso de criopreservación. Por lo tanto, estos resultados demostraron que los peores resultados fueron obtenidos después de congelar las muestras espermáticas con UHT-Co (control) produciendo espermatozoides estáticos (sin cinética), sin progresividad, velocidades, desplazamiento de cabeza ni movimiento del flagelo.

Las motilidades, a pesar de las ventajas mostradas con el diluyente INRA, sus porcentajes fueron afectados drásticamente por el mismo proceso de la congelación y descongelación registrando una reducción significativa ($P < 0,0001$) de la MT y MP en todos los grupos (LC y controles) y ambos diluyentes (INRA y UHT). El grupo INRA-LC25 mostró una MT post-descongelación más alta que el grupo INRA-Co ($P < 0,05$) y que los grupos UHT (Co y LC25) ($P < 0,01$). Estos resultados sugieren que la LC suplementada al diluyente INRA (25 mM) posee un efecto crioprotector que permite preservar la MT durante el proceso de criopreservación. Por otro lado, la MP antes (pre-congelación) y después (post-descongelación) de la criopreservación fue superior ($P < 0,01$) con el grupo INRA-LC25 en comparación con los grupos UHT (Co y LC25). Sin embargo, a pesar de esa ventaja con el diluyente INRA, los resultados muestran una reducción de más del 50% de MP después de la descongelación (65,1% vs. 15,3% para INRA-Co; y 74,7% vs. 15,3% para INRA-LC25, respectivamente) (Fig 25).

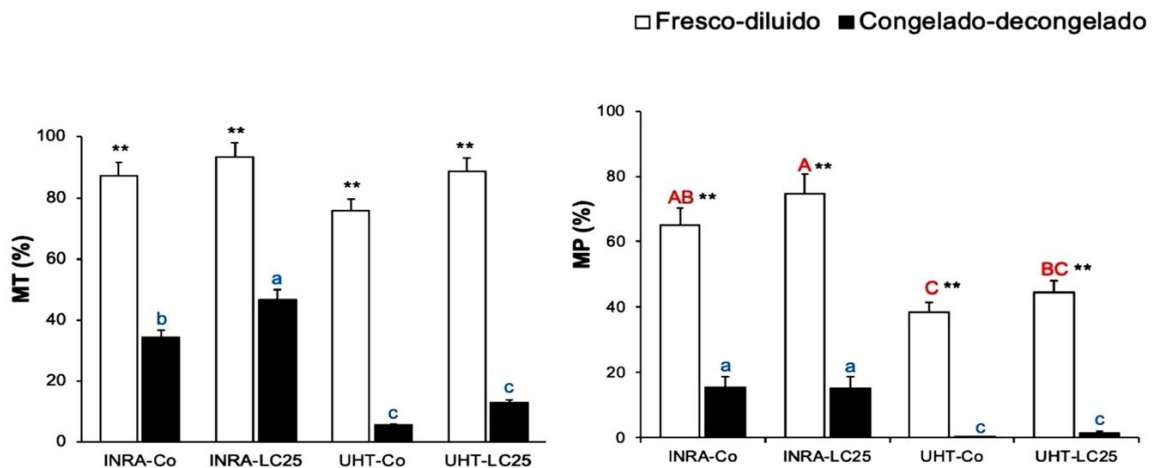


Fig 25. Motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %) de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas de motilidades entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas por tratamientos ($P < 0,0001$). ^{A-C} Letras mayúsculas diferentes en barra blancas expresan diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas (^{A-B-C} $P < 0,05$; ^{A-C} $P < 0,01$). ^{a-c} Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre grupos en muestras congeladas-descongeladas (^{a-b-c} $P < 0,05$; ^{a-c} $P < 0,01$).

Eficientemente, las muestras diluidas con INRA y suplementadas o no con LC (25 mM) no difirieron ($P > 0,05$) sus velocidades (VCL, VAP y VSL) entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas. En el análisis de las muestras congeladas – descongeladas, la VCL, VAP y VSL de las muestras diluidas con INRA y suplementadas o no con LC (INRA-LC25 e INRA-Co) fueron más altas que aquellas muestras diluidas con UHT y suplementadas (UHT-LC25, $P < 0,001$) o no (UHT-Co, $P < 0,0001$) con LC (Fig 26).

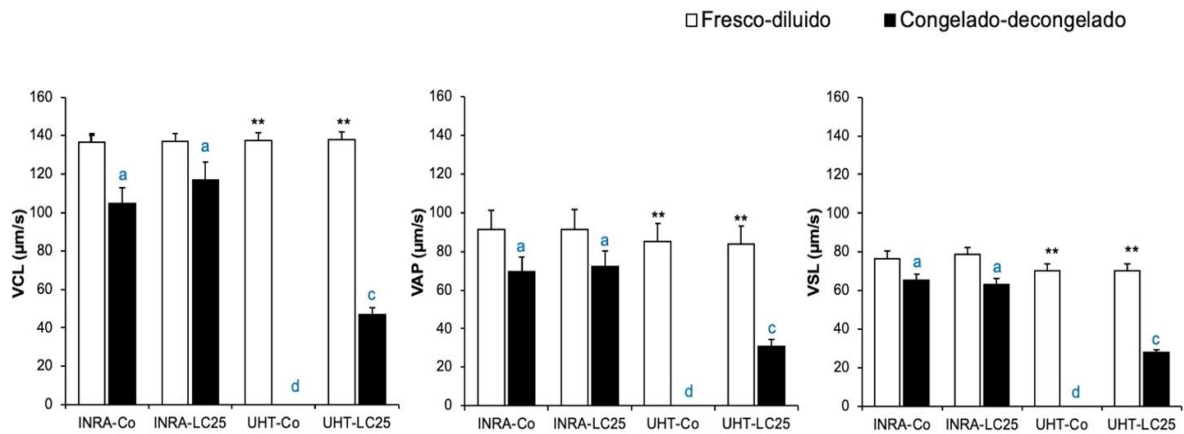


Fig 26. VCL, VAP y VSL de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas de diferentes tratamientos y velocidades ($P < 0,0001$). ^{a-d}. Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras congeladas-descongeladas (^{a-c-d} $P < 0,001$; ^{a-d} $P < 0,0001$).

El porcentaje de LIN fue mejorado en las muestras frescas después de diluir con INRA-LC25, registrando porcentajes más altos comparados con las muestras diluidas con UHT-LC25 y UHT-Co. En el análisis de las muestras congeladas – descongeladas, la STR, LIN y WOB de las muestras diluidas con INRA y suplementadas o no con LC (INRA-LC25 e INRA-Co) fueron más altas que aquellas muestras diluidas con UHT y suplementadas (UHT-LC25, $P < 0,001$) o no (UHT-Co, $P < 0,0001$) con LC (Fig 27).

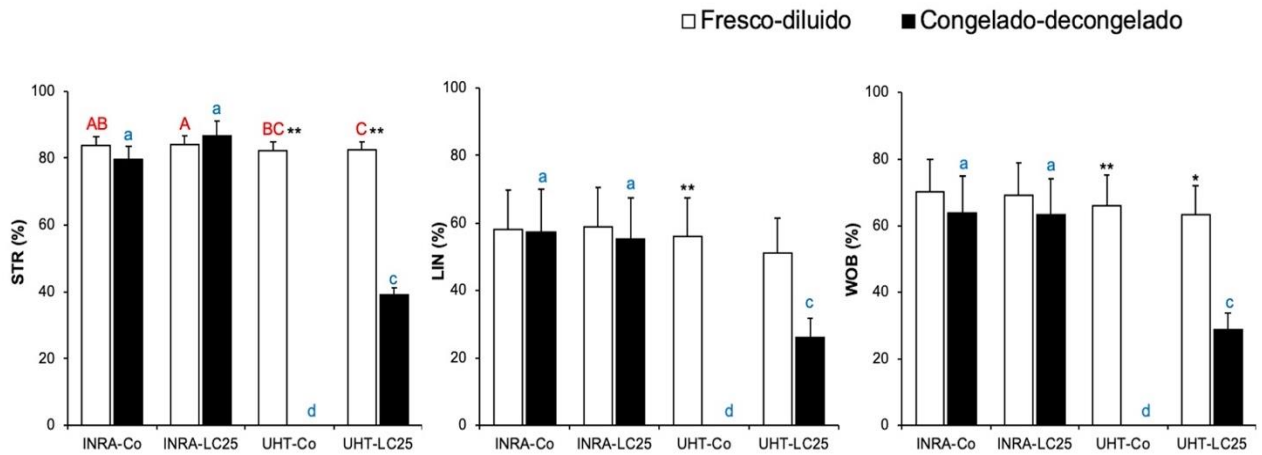


Fig 27. STR, LIN y WOB de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas de diferentes tratamientos y parámetros (* $P < 0,001$; ** $P < 0,0001$). A-C Letras mayúsculas diferentes en barra blancas expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas – diluidas ($A-B < 0,05$; $A-C < 0,01$). a-d Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras congeladas – descongeladas ($a-c < 0,001$; $a-d < 0,0001$).

Eficientemente, las muestras diluidas con INRA y suplementadas o no con LC (25 mM) no difirieron ($P > 0,05$) la ALH y BCF entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas. En el análisis de las muestras congeladas – descongeladas, la ALH y BCF de las muestras diluidas con INRA y suplementadas o no con LC (INRA-LC25 e INRA-Co) fueron más altas que aquellas muestras diluidas con UHT y suplementadas (UHT-LC25, $P < 0,001$) o no (UHT-Co, $P < 0,0001$) con LC (Fig 28).

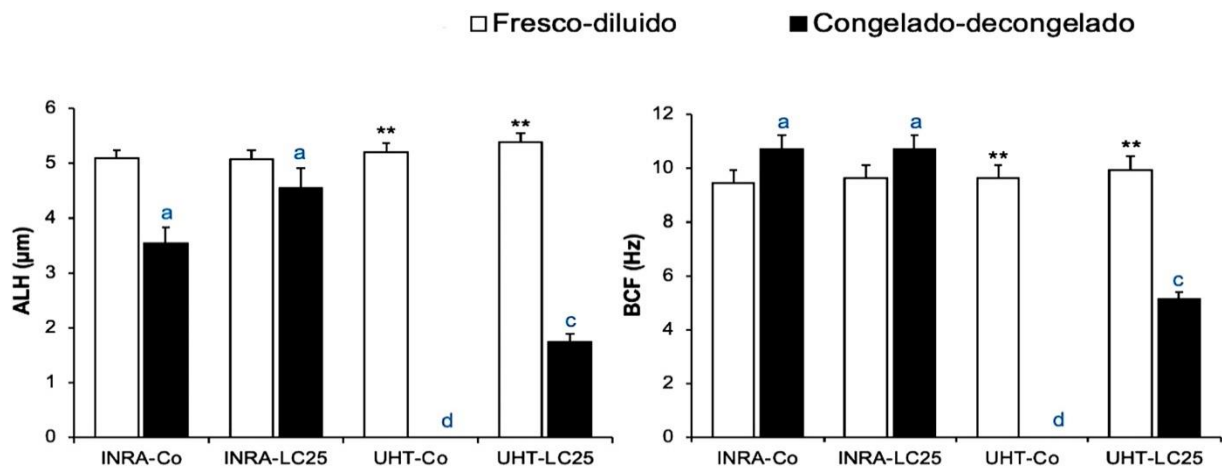


Fig 28. ALH y BCF de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas de diferentes tratamientos y parámetros ($P < 0,0001$). ^{a-d} Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras congeladas – descongeladas (^{a-c-d} $P < 0,001$; ^{a-d} $P < 0,0001$).

5.2.2.3. Integridad de las membranas espermáticas

En general, todas las subcategorías de la prueba de doble fluorescencia simultánea PI /PNA-FITC (IPIA, IPDA, DPIA y DPDA) de las muestras congeladas con los ambos diluyentes fueron afectados ($P < 0,001$) por el proceso de criopreservación. Además, las muestras diluidas con UHT-Co (sin LC) mostraron peores porcentajes de integridad de las membranas plasmática y acrosomal después del proceso de criopreservación.

La prueba de doble fluorescencia simultánea PI/PNA-FITC indicó que el porcentaje de IPIA fue afectado drásticamente ($P < 0,0001$) por el proceso de criopreservación después de congelar con ambos diluyentes suplementados o no con LC. En las muestras frescas (pre-congelación), el porcentaje de IPIA fue mayor ($P < 0,05$) con INRA-LC25, INRA-Co y UHT-LC25 que con UHT-Co; sin embargo, en muestras congeladas – descongeladas, las muestras diluidas con INRA-LC25 registró porcentajes más altos de IPIA que las muestras diluidas con INRA-Co ($P < 0,05$) y UHT (LC25 y Co) ($P < 0,01$). El porcentaje de la subcategoría indeseable DPIA, también fue



afectado por la criopreservación, registrándose un incremento significativo ($P < 0,001$) de sus valores después de diluir con INRA-Co, INRA-LC25 y UHT-LC25. En las muestras frescas, la DPIA fue menor con INRA-LC25, INRA-Co y UHT-LC25 que con UHT-Co; mientras que, en muestras congeladas – descongeladas, las muestras diluidas con INRA-LC25 registró una DPIA más baja ($P < 0,05$) que aquellas muestras diluidas con UHT-Co. Asimismo, la subcategoría indeseable DPDA fue también afectada drásticamente ($P < 0,0001$) por el proceso de criopreservación después de congelar con ambos diluyentes suplementados o no con LC. Además, en muestras congeladas – descongeladas, las muestras diluidas con INRA-LC25, INRA-Co y UHT-LC25 fueron más bajas ($P < 0,01$) que las muestras diluidas con UHT-Co (Fig 29).

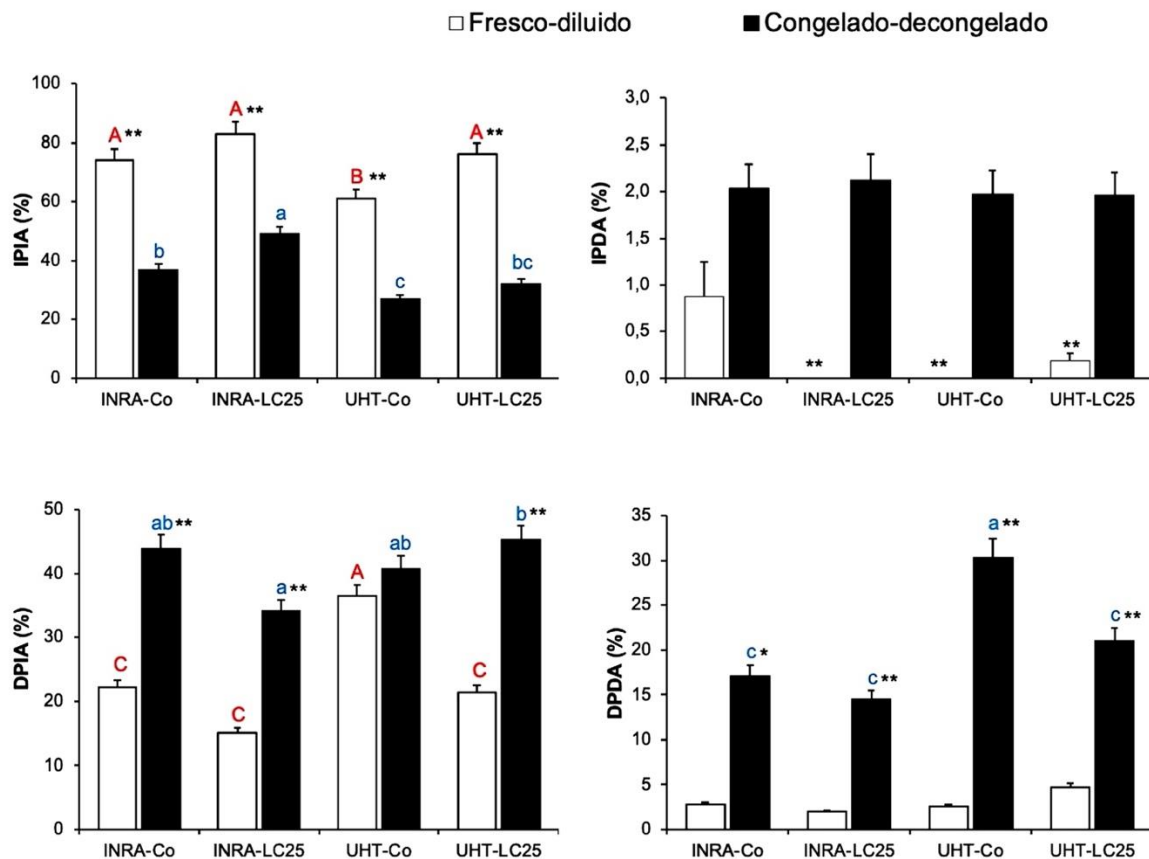


Fig 29. Subcategorías de fluorescencia de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas entre muestras frescas – diluidas y congeladas – descongeladas de diferentes tratamientos y subcategorías ($P < 0,0001$). ^{A-C} Letras mayúsculas diferentes en barra blancas expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas – diluidas ($A-B-C P < 0,05$; $A-C P < 0,01$). ^{a-c} Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras congeladas-descongeladas ($a-b-c P < 0,05$; $a-c P < 0,01$).

La integridad de la membrana plasmática (IMP) y membrana acrosomal fueron afectados drásticamente ($P < 0,0001$) por el proceso de criopreservación en todos los grupos de congelación. En las muestras frescas, el porcentaje de IPM fue mayor ($P < 0,01$) con INRA-LC25, INRA-Co y UHT-LC25 que con UHT-Co; mientras que, en muestras congeladas – descongeladas, las muestras diluidas con INRA-LC25 registró porcentajes más altos de IPIA que las muestras diluidas con INRA-Co ($P < 0,05$) y UHT

(LC25 y Co) ($P < 0,01$). Por otro lado, en muestras diluidas con UHT-Co y congeladas - descongeladas fueron más bajas ($P < 0,05$) que aquellas muestras diluidas con los otros grupos de congelación (Fig 30).

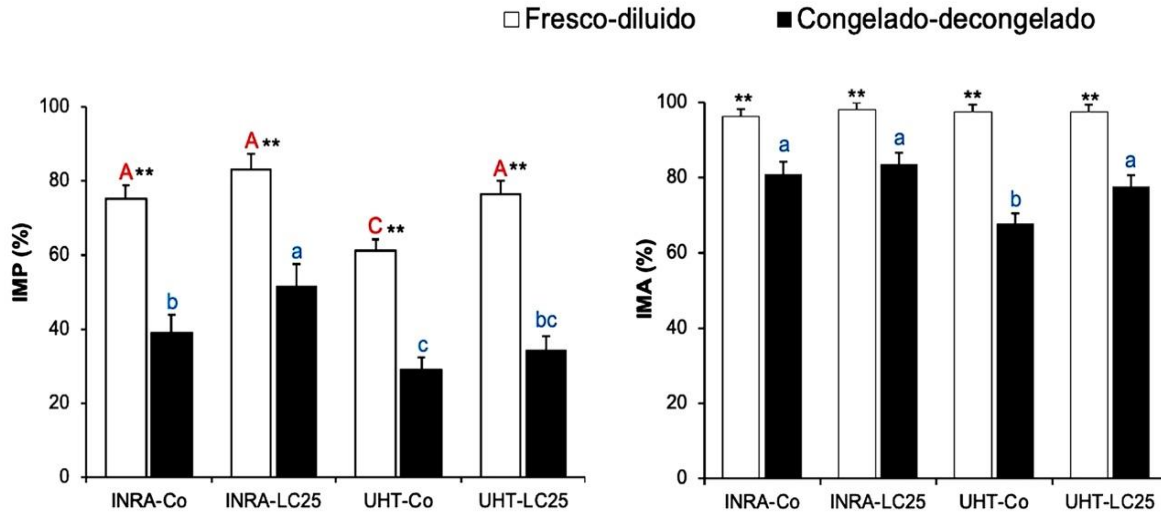


Fig 30. IMP e IMA de muestras espermáticas de caballo frescas – diluidas y congeladas – descongeladas con o sin LC usando dos diluyentes: INRA-LC25, INRA-Co, UHT-LC25 y UHT-Co. ** Asteriscos muestran diferencias significativas entre frescas – diluidas y congeladas – descongeladas de diferentes tratamientos y variables ($P < 0,0001$). A-C Letras mayúsculas diferentes en barra blancas expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas ($P < 0,01$). a-c Letras minúsculas diferentes en barras negras expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras congeladas-descongeladas ($a-b-c P < 0,05$; $a-c P < 0,01$).



6. DISCUSION

La presente investigación evaluó el efecto que tuvo la *L-carnitina* suplementada a dos diluyentes de origen no sintético basados en leche desnatada, sobre la calidad y criosupervivencia de espermatozoides de caballo peruano de paso, evaluada en dos experimentos, uno que determinó la dosis más idónea de *L-carnitina* adicionada a ambos diluyentes en muestras individuales, y otro que evaluó la supervivencia espermática después de los procesos de refrigeración y congelación en muestras agrupadas. Los resultados demostraron que la suplementación de 1 a 50 mM *L-carnitina* a los diluyentes INRA-96 y UHT no tuvieron efectos benéficos sobre las muestras espermáticas frescas – diluidas (0 h). Sin embargo, con 25 mM de *L-carnitina* adicionada a ambos diluyentes produjo mayores ventajas en la cinética (ej. MT, MP, VCL y VSL) y en la integridad de membranas plasmática y acrosomal (ej. IPIA e IMP) bajo condiciones de refrigeración a mediano (48 h) y largo plazo (96 h) en muestras individuales. Consecuentemente, en muestras agrupadas (pools), el diluyente INRA produjo mejores resultados de cinética e integridad de membranas espermáticas que el diluyente UHT. La suplementación de *L-carnitina* (25 mM) al diluyente INRA produjo una mayor motilidad (MT) e integridad de membranas espermáticas (IPIA e IMP) en muestras congeladas – descongeladas. Mientras que al diluyente UHT, a pesar de que los resultados fueron bajos, la adición de LC produjo un incremento de las velocidades (VCL, VAP y VSL), parámetros de relación (STR, LIN y WOB) e integridad de la membrana acrosomal (IMA) en muestras frescas, refrigeradas durante 24 – 72 h, o congeladas – descongeladas.

Los espermatozoides equinos no toleran el enfriamiento, mostrando un gran estrés al choque de frío y disminución de los parámetros de motilidad y viabilidad (Bateller et al., 2001; Brinsko et al., 2000). En efecto, algunos caballos reproductores no alcanzan el mismo porcentaje de fertilidad con semen refrigerado que con semen fresco, lo que reduce su valor comercial a nivel de campo (Province et al., 1985). De hecho, se ha determinado que no todos los caballos (ej. Caballo peruano de paso fino) proporcionan eyaculados que mantienen una calidad aceptable después del almacenamiento en frío, lo que influye en las tasas de preñez (Ecot et al., 2000; Loomis, 2001). A este punto, se ha determinado que el diluyente (Neuhauser et al., 2018) y temperatura (Gibb & Aitken, 2016) de almacenamiento influyen en la calidad



y fertilidad de esperma equino. Reportes previos han demostrado que la fertilidad de semen equino no varía después de diluir con INRA-96 y almacenarlo a 15 °C ó 5 °C durante 72 horas (Vidament et al., 2012). En otros estudios, sin embargo, se demostró que la motilidad y fertilidad de espermatozoides almacenados a 15 °C en diluyentes a base de leche desnatada durante 12 y 24 horas disminuyeron notablemente (Batellier et al., 1998; Price et al., 2008). Esta disminución ha sido atribuida posiblemente a los efectos tóxicos de los componentes de la leche desnatada a los espermatozoides almacenados a temperaturas más altas (ej, 15 °C vs. 5 °C) (Batellier et al., 1997). En este sentido, los diluyentes no sintéticos a base de leche desnatada han sido usados para preservar espermatozoides equinos a bajas temperaturas (5 a 8 °C) con resultados de calidad espermática *in vitro* y fertilidad mejorada después de 24 horas de refrigeración (Pugliesi et al., 2012). No obstante, existen pocos reportes del almacenamiento de espermatozoides equinos a largo plazo bajo condiciones de refrigeración (5 °C). En respuesta a esta dificultad, algunas alternativas han sido realizadas para incrementar la calidad espermática *in vitro* e *in vivo*, como el almacenamiento de semen equino a temperatura ambiente (20 a 22°C) en conjunción con la suplementación de aditivos antioxidantes como el piruvato de sodio y *L-carnitina* (Gibb et al., 2015), desafortunadamente, existe escasa evidencia que valide este efecto sobre la fertilidad lograda en campo.

La *L-carnitina* es un aditivo, sintetizado a partir de los aminoácidos esenciales lisina y metionina, que juega un papel importante en el metabolismo de los espermatozoides, proporcionando energía fácilmente disponible a través de la oxidación- β , que afecta positivamente la motilidad de los espermatozoides (Jeulin et al., 1987; Ramsay et al., 2001; Goumenou & Koumantakis, 2000). Este efecto beneficioso está mediado por el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias, que pueden reducir la disponibilidad de lípidos para la peroxidación (LPO), actuando también como antioxidante (Neuman et al., 2002) y osmolito (Gibb et al., 2015). En los caballos, las carnitinas seminales se correlacionan con el recuento de espermatozoides y la motilidad progresiva (Stradaioli et al., 2000). Estudios anteriores realizados en espermatozoides informaron que la *L-carnitina* tuvo un efecto positivo sobre la motilidad de los espermatozoides (Herfen et al., 1997). En este mismo sentido, Stradaioli et al. (2004) determinaron que la administración oral de *L-carnitina*



a caballos astenospérmicos mejora la calidad y morfología de los espermatozoides refrigerados durante 72 horas.

Sin embargo, todos estos estudios fueron diseñados para evaluar el efecto de la *L-carnitina* como nutracéutico (vía oral) durante al menos 60 días de tratamiento. Otros estudios no encontraron ningún efecto de la *L-carnitina* sobre las características seminales en caballos (Rosa Filho et al., 2001). En estudios más recientes se demostró que la *L-carnitina* mejora las características espermáticas de caballo agregando de manera sintética a los eyaculados. En este sentido, Gibb et al. (2015) demostraron que suplementando con 50 mM de *L-carnitina* y 10 mM de piruvato de sodio a un diluyente a base de leche desnatada facilita el almacenamiento de los espermatozoides equinos a temperatura ambiente (20°C) durante 72 h al respaldar la producción de ATP mitocondrial al tiempo que minimiza el agotamiento de ATP y los efectos dañinos de los subproductos metabólicos como los radicales libres. Otro estudio realizado por Potter (2015) demostró que suplementando con 50 mM de *L-carnitina* con o sin 0,40 mM de piruvato de sodio a dos diluyentes a base de leche desnatada: uno llamado Keney (con glucosa) y otro comercial INRA-96, mejoraron múltiples factores de supervivencia de espermatozoides de caballo mantenidos en refrigeración durante 48 horas. Un trabajo reciente realizado por Nery et al. (2020), demostraron que suplementando con 1 o 2 mM de *L-carnitina* a un diluyente a base de leche desnatada preserva la motilidad de espermatozoides equinos hasta por 72 horas de almacenamiento a 5°C.

Los resultados del presente estudio son consistentes con los resultados obtenidos en los estudios antes mencionados, al mejorar características cinéticas e integridad de membranas espermáticas ya sea con diluyentes INRA o UHT (leche desnatada + yema de huevo) suplementados con 25 mM de *L-carnitina*. En consecuencia, las motilidades obtenidas en muestras frescas – diluidas (MT= >85% y MP= >60%) y refrigeradas corto plazo durante 24 h (MT= >80%; MP= >50%) o 48 h (MT= >60%; MP= >35%) pueden ser usadas exitosamente en programas de IA equina según lo recomendado por Samper, (2009). De hecho, la cifra mínima recomendada por la industria equina para IA es del 25% al 30% (Ng et al., 2004). Por lo antes mencionado, los resultados del presente estudio siguieron que la *L-carnitina* mejora la motilidad de los espermatozoides almacenados en frío y además estimula el



movimiento de los espermatozoides previamente móviles que han agotado sus reservas de ATP, como ha sido previamente demostrado en espermatozoides porcinos (Jeulin et al., 1994), humanos, ovinos y de ratas (Brooks, 1979). Además, la suplementación de 5 mM de *L-carnitina* a un diluyente a base de leche desnatada UHT suplementado con 6% (v/v) de yema de huevo mejoró las motilidades, velocidades (curvilínea y rectilínea) e integridad de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial de esperma de carnero refrigerado hasta 96 horas (Galarza, 2019; Galarza et al., 2020).

El proceso de congelación y descongelación de espermatozoides equinos reduce un gran porcentaje de la subpoblación es espermatozoides viables y móviles, lo que supone una disminución de la fertilidad después de la IA en condiciones de campo. Durante la criopreservación, los espermatozoides son susceptibles a diversas tensiones durante los procesos de congelación y descongelación (Parks & Graham, 1992), y en efecto, daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales ocurren en varios espermatozoides que disminuyen la criosupervivencia (Maxwell et al., 1993). Estos incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial y acrosoma (reacción acrosómica) (Moreno & Galarza, 2019). Igualmente, los procesos de congelación – descongelación determinan una desestructuración de los microtúbulos que conforman el flagelo del espermatozoide. Las alteraciones de membrana y de microtúbulos están determinadas por el daño osmótico que se produce durante el proceso de congelación- descongelación (Moreno & Galarza, 2019). En resumen, estos eventos disminuyen la motilidad, integridad estructural y capacidad fecundante de los espermatozoides equinos. De hecho, se ha determinado que los parámetros de motilidad y viabilidad se reducen entre un 30 a 50% comparado con los valores pre-congelación en la mayoría de especies domésticas (Watson, 1995; Watson, 2000).

Los resultados de la presente investigación evidenciaron una drástica reducción de la motilidad y viabilidad con respecto a sus valores antes de la congelación. La congelación de esperma equino con INRA + *L-carnitina* (25mM), redujo la MT del 93,3% al 46,6% y la viabilidad (IMP) del 83,0% al 51,4%; mientras con UHT + *L-carnitina* redujo la MT del 88,6% al 12,9% y la IMP del 76,2% al 34,2%. Esta drástica



reducción se puede atribuir a factores deletéreos propios de la criopreservación de espermatozoides equinos (Aurich, 2005) que depende principalmente de la producción de cristales de hielo intra y extracelular, deshidratación y estrés osmótico (Holt et al., 2014) que son regulados por las velocidades de enfriamiento durante la criopreservación (Mazur, 1984; Grötter et al., 2019). Sin embargo, a pesar de esta reducción drástica de los valores de motilidad y viabilidad, esta investigación constituye uno de los reportes iniciales de la criopreservación de espermatozoides de Caballo Peruano de paso con la suplementación de *L-carnitina*. De hecho, hasta donde se conoce, solo existe un reporte sobre la criopreservación de semen de caballo peruano de paso (Santiani et al., 2017) y los resultados muestran una motilidad de 11,6% a 55,7% usando un diluyente a base de leche desnatada + 28% yema de huevo y del 3 – 5% ya sea de glicerol, dimetilformamida, etilenglicol o dimetilsufóxido. Los resultados de la presente investigación son consistentes con los obtenidos por Santiani et al. (2016) dado que la MT obtenida usando UHT+6% yema de huevo + 5% glicerol obtuvo una motilidad total del 12,9%.

La velocidad de enfriamiento durante la criopreservación es uno de los factores que más influye en la criosupervivencia espermática (Mazur, 1974). El protocolo de congelación de la presente investigación incluyó un cryo-box con 3,4 litros de NL_2 , dos rampas de congelación (a 17 y 7 cm del nivel de NL_2 , respectivamente) y pajuelas de 0,25 mL; la congelación fue realizada por la exposición de las pajuelas a los vapores de NL_2 estático. La evaluación de la temperatura interna (T_{in}) registró una velocidad de enfriamiento inicial de 9,17 °C/min durante el rango crítico de temperatura (-5 °C a -15 °C) donde ocurrió la nucleación de cristales de hielo (-8,5 °C a los 15 s) y la disipación del calor latente de fusión (41s). Esta velocidad inicial sugiere que este protocolo de criopreservación es muy cercano a lo recomendable debido a las velocidades de enfriamiento inicial son relativamente lentas y óptimas según lo recomendado por Mazur (1984). En efecto, al usar una velocidad inicial de 9,17 °C/min la mayoría de las células (equivalente al 50) se deshidratarían eficientemente evitando un estrés osmótico y quedando inmersas en las soluciones hipertónicas (veins) durante la congelación (Holt & Penfold, 2014); y recobrarían su estructura normal (rehidratación óptima) durante la descongelación (Katkov et al., 2012), si perder la capacidad de movimiento y reservas de ATP. En este sentido, Woelders & Chaveiro



(2004) sugieren usar velocidades de enfriamiento lentas al inicio de la congelación y a partir de la nucleación de hielo acelerar (ej. 60 a 100°C/min), según las predicciones matemáticas de velocidades de enfriamiento óptimas para la criopreservación de espermatozoides. Protocolos de congelación con dos velocidades de enfriamiento por aceleración usando velocidades iniciales lentas como 4 o 5 °C/min y luego acelerando después de la disipación del calor latente de fusión (35 a 60 °C/min), han sido usadas eficientemente en la criosupervivencia de espermatozoides de carnero y rumiantes silvestres basados en motilidad, integridad de membranas espermáticas (plasma, acrosoma y mitocondria) e integridad de ADN (Galarza et al., 2019b; 2019c; Estes et al., 2018). Los resultados de la presente investigación demostraron que al congelar vapores de NL₂ estático (equilibrado 30 minutos antes de la criopreservación) generó dos velocidades de enfriamiento promedios por aceleración: 19 y 47 °C/min, lo que probablemente influyó para lograr una criosupervivencia aceptable. Nosotros podemos especular que usando este protocolo de congelación y suplementando con 25 mM de *L-carnitina* al diluyente INRA-Freeze fue efectivo al obtener ventajas de motilidad total e integridad de las membranas espermáticas (IPIA e IMP) comparado con su contraparte control. Este efecto también fue evidenciado con el diluyente UHT, desafortunadamente, la respuesta de criosupervivencia basada en motilidad e integridad de membranas espermáticas fue demasiado baja.

El factor “individual” juega un rol muy importante sobre la criosupervivencia espermática en caballos y la fertilidad (Loomis & Graham, 2008). Existen diferencias inherentes en la capacidad de los espermatozoides, de diferentes machos, para sobrevivir a la criopreservación (refrigeración y congelación). Existen diferencias no solo entre especies en las tasas de supervivencia de los espermatozoides (Darin-Bennett & White, 1977), sino también entre machos individuales dentro de una especie. Se ha sugerido que la variación de criosupervivencia espermática equina entre una misma raza, individuos y/o eyaculados, se debe básicamente a la bioquímica y metabolismo de los espermatozoides y su respuesta al proceso de criopreservación (Amann and Pickett, 1987; Hammerstedt et al., 1990). Asimismo, se ha determinado que existe diferencias en la composición del plasma seminal entre individuos (reproductores), o incluso entre eyaculados de mismo caballo, así como en los niveles de *L-carnitina* del plasma seminal (Grizard et al., 1992; Aurich et al., 1996).



Además, se conoce que, durante la criopreservación de semen equino, es común obtener eyaculados de mala calidad, que contienen una gran cantidad de espermatozoides defectuosos, de sementales envejecidos y/o subfértiles que son genéticamente excelentes (Stradaioli et al., 2004). Se podrían aplicar tratamientos terapéuticos o aplicar técnicas de reproducción asistidas (ej. selección espermática antes y después de la congelación) para mejorar la calidad del semen que permitirían utilizar estos valiosos animales en programas de cría. Los resultados sugieren que la raza de caballos peruano de paso produjo una respuesta diferente entre reproductores (covariable) debido a la inconsistente respuesta espermática obtenida durante la refrigeración, independientemente de la adición de *L-carnitina*. Sin embargo, durante la congelación, el análisis incluyó una agrupación de eyaculados para controlar, en cierta medida, la variabilidad individual. De esta manera, los resultados mostraron que, al controlar este efecto, la criosupervivencia celular basada en motilidad y viabilidad fue mejorada con la adición de L-carnitina a ambos diluyentes.



7.CONCLUSIONES

La presente investigación concluye que:

- La calidad de espermatozoides de caballo peruano de paso, basado en cinética (motilidades y velocidades) e integridad de las membranas plasmática y acrosomal, disminuye según incrementa el tiempo de almacenamiento en refrigeración a mediano (48 h) y largo plazo (96 h), independientemente del tipo de diluyente y/o la adición de L-carnitina.
- La suplementación de 1 – 50 mM de *L-carnitina* a los diluyentes no sintéticos basados en leche desnatada no mejora la calidad espermática de la muestras frescas y diluidas ya sea con INRA-96 y UHT (con 6% de yema de huevo). Sin embargo, el efecto estimulante de locomoción y protector de las membranas espermáticas de la *L-carnitina* fue evidenciado en condiciones de refrigeración.
- La dosis de 25 mM de *L-carnitina* suplementada a ambos diluyentes produjo mejores resultados de supervivencia espermática basado en motilidades, velocidades e integridad de membranas plasmática y acrosomal, durante 96 horas de refrigeración.
- El diluyente INRA-96 preservó mejor las características espermáticas que el diluyente UHT después de los procesos de refrigeración – calentamiento y congelación – descongelación
- La *L-carnitina* suplementada al diluyente INRA-Freeze mejoró la motilidad e integridad de la membrana plasmática de espermatozoides equinos congelados – descongelados; sin embargo, con el diluyente UHT mejoró únicamente la integridad de la membrana acrosomal.



8. RECOMENDACIONES

- Fomentar el uso de la criopreservación para así optimizar y mejorar la reproducción en equinos.
- Desarrollar capacitaciones a los criadores y propietarios de la Asociación de Caballos Peruanos de Paso en el Ecuador sobre las innovaciones biotecnológicas que incluyen el uso de antioxidantes y crioprotectores con el fin de mejorar la reproducción mediante inseminación artificial.
- Para futuras investigaciones se podría tomar en cuenta este trabajo de tesis para llevar a cabo protocolos que permitan medir las tasas de preñez en esta raza de caballos.
- Se requiere de más estudios relacionados al uso de la L-carnitina en un mayor número de animales y razas de caballos.



9. REFERENCIAS

- Agarwal, A., & Said, T. M. (2004). Carnitines and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 8(4), 376-384. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60920-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60920-0)
- Aliabadi, E., Mehranjani, M. S., Borzoei, Z., Talaei-Khozani, T., Mirkhani, H., & Tabesh, H. (2012). Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 10(2), 77-82.
- Amann, R.P., Pickett, B.W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7, 145–173.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Banking*, 17(4), 745-756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
- Arroyo-Salvo, C., Sanhueza, F., Fuentes, F., Treulén, F., Arias, M. E., Cabrera, P., ... Felmer, R. (2019). Effect of human tubal fluid medium and hyperactivation inducers on stallion sperm capacitation and hyperactivation. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 184-194. <https://doi.org/10.1111/rda.13328>
- Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- Aurich JE, Ktibne JA, Hoppe H, et al. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*. 46, 791–797.
- Avila, L., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., ... Gómez, C. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Banaszewska, D., Czubaszek, M., Walczak-Jędrzejowska, R., & Andraszek, K. (2015). Morphometric dimensions of the stallion sperm head depending on the staining method used. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(2), 263-270. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0039>
- Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R., & Bayachou, M. (2014). Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia*, 46(6), 637-641. <https://doi.org/10.1111/and.12130>
- Barwe, V. K., Tomar, S. S., & Qureshi, M. I. (2003). Factors affecting calving interval and its genetic and phenotypic relationship with other reproductive traits in GIR cows. *Indian Veterinary Journal*, 80(2), 128-131.



- Batellier, F. V. M. F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., & Magistrini, M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 181-190.
- Batellier, F., Duchamp, G., Vidament, M., Arnaud, G., Palmer, E., & Magistrini, M. 1998. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 C under aerobic conditions. *Theriogenology*, 50(2), 229-236.
- Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., & Palmer, E. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 48(3), 391-410.
- Baumber, J., Ball, B. A., & Linfor, J. J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, 66(5), 772-779. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.772>
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., & Torner, H. (2001). Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 65(1-2), 75-88. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00214-1)
- Brinsko, S. P., Van Wagner, G. S., Graham, J. K., & Squires, E. L. 2000. Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 111-120.
- Brito, L. F. C. (2007). Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249-264. <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2007.09.004>
- Castro, K., & González, S. (2017). Métodos modernos de evaluación seminal en equinos Modern Methods Of Seminal Evaluation In Equine. *Seminario de Profundización en Reproducción Equina*.
- Darin-Bennett, A., White, I.G., 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466–470
- Dascanio, J. J., and Miller, L. M. 2021. Computer-Assisted Sperm Analysis. *Equine Reproductive Procedures*, 491-494.
- De Oliveira, R., Wolf, C., De Oliveira, M. A. Ô., & Gambarini, M. (2013). Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(12), 1148-1152. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.05.001>
- Delgado-Bermúdez, A., Noto, F., Bonilla-Correal, S., Garcia-Bonavila, E., Catalán, J., Papas, M., ... Yeste, M. (2019). Cryotolerance of stallion spermatozoa relies on aquaglyceroporins rather than orthodox aquaporins. *Biology*, 8(4), 1-18. <https://doi.org/10.3390/biology8040085>
- Demarquoy, J. (2011). L-carnitine: Structure and Function . *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-



8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0023200>
- Dini, P., Troch, L., Lemahieu, I., Deblende, P., & Daels, P. (2019). Validation of a portable device (iSperm®) for the assessment of stallion sperm motility and concentration. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(8), 1113-1120. <https://doi.org/10.1111/rda.13487>
- Duque, J. E., Rojano, B., & Restrepo, G. (2017). Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente TT - Cryotolerance of Stallion Semen Frozen with Additives in the Extender. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 120-129. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12944>
- Ecot, P., Vidament, M., De Mornac, A., Perigault, K., Clement, F., & Palmer, E. 2000. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 141-150.
- El-Raey, M., Badr, M., Assi, M., & Rawash, Z. (2016). L-carnitine enhancing roles on Buffalo semen freezability, ultra structure and fertilizing potentials. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 62(149), 163-173.
- Esteso, M. C., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., Lopez-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. 2018. Effect of two cooling protocols on the post-thaw characteristics of Iberian ibex sperms. *Cryobiology*, 80, 12-17.
- Gadella, B. M., Rath, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 249-265. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00161-0)
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2020). Supplementing a skimmed milk-egg yolk-based extender with L-carnitine helps maintain the motility, membrane integrity and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 0-2. <https://doi.org/10.1111/rda.13687>
- Galarza, López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Moreno. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Elsevier*, 192, 261-270.
- Galarza, D. A. 2019a. Optimización de la criopreservación (refrigeración y congelación) de espermatozoides de morueco para su aplicación en inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) transcervical. Doctoral Thesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. 2019b. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, 91, 84-89.



- Galarza, D. A., Lopez-Sebastian, A., & Santiago-Moreno, J. 2019. Effectiveness of two-step accelerating cooling rate on post-thaw characteristics of ram sperm. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 54, pp. 113-113). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
- Gibb, Z., Lambourne, S. R., Quadrelli, J., Smith, N. D., & Aitken, R. J. (2015). L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of Reproduction*, 93(4), 1-9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131326>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. 2016. Recent developments in stallion semen preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29-S36.
- Goumenou, A., & Koumantakis, E. 2000. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality. *Int J Fertil Womens Med*, 45(236240), 106123Nair.
- Grizard G, Vignon N, Boucher D. 1992. Changes in carnitine and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. *Hum Reprod*. 7, 1245–1248.
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665.
- Gutiérrez, L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal*. 245.
- Harmeyer, J. (2002). The Physiological Role of L-Carnitine. *Lohmann Information*, (27), 1-8. Recuperado de http://lohmann-information.de/content/l_i_27_article_3.pdf
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*. 11, 73–88
- Herfen, K., Harmeyer, J., Bostedt, H., & Baumgartner, M. 1997. The impact of carnitin on sperm quality of stallions. *Reproduction in Domestic Animals*. 32, 77.
- Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. *Animal andrology: Theories and applications*, Pag: 76.
- Holt, W. V., & Penfold, L. M. 2014. *Animal andrology: theories and applications*. *Animal Andrology: Theories and Applications*, 78-81.
- Hoogewijs, M.K., De Vlieghe, S.P., Govaere, J.L., De Schauwer, C., De Kruif, A., Van Soom, A., 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet. J.* 44, 542–549. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00523.x>



- Hoppel, C. (2003). The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, 41(4 SUPPL. 4), 4-12. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00112-4)
- Jeulin, C., & Lewin, L. M. (1996). Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(2), 87-102. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.2.87>
- Jeulin, C., Soufir, J., Marson, J., Paquignon, M., & Dacheux, J. L. 1987. The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the epididymis and epididymal spermatozoa of the boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, 79(2), 523-529. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790523>
- Jeulin, C., Dacheux, J. L., & Soufir, J. C. 1994. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *Reproduction*, 100(1), 263-271.
- Katkov, I. I., Sushko, A. B., Lulat, A. G. M., Grigoriev, A. Y., Isachenko, E., Yakhnenko, I., ... & Sokol, Y. I. 2012. Kinetic vitrification of spermatozoa of vertebrates: what can we learn from nature. INTECH Open Access Publisher.
- Kozink, D. M., Estienne, M. J., Harper, A. F., & Knight, J. W. (2004). Effects of dietary L-carnitine supplementation on semen characteristics in boars. *Theriogenology*, 61(7-8), 1247-1258. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.022>
- Lehti, M. S., & Sironen, A. (2017). Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of reproduction*, 97(4), 522-536.
- Lecitina, U. S. O. D. E., Para, D. E. S., Semen, C., Art, E., Investigaci, C. D. E., Aires, B., ... Aires, B. (2020). *Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino*. 22(1), 41-49.
- Little, T. V., & Holyoak, G. R. (1992). Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 8(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30464-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30464-9)
- Loomis, P. R. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 191-200.
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 119-128.
- Maxwell, W. M., Evans, G., Rhodes, S. L., Hillard, M. A., & Bindon, B. M. 1993. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low numbers of fresh



- or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction, fertility and development*, 5(1), 57-63. <https://doi.org/10.1071/RD9930057>
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- Medan, M. S., Absy, G., Zeidan, A. E., Khalil, M. H., Khalifa, H. H., Abdel-Salaam, A. M., & Abdel-Khalek, T. M. (2008). Survival and fertility rate of cooled dromedary camel spermatozoa supplemented with catalase enzyme. *Journal of Reproduction and Development*, 54(1), 84-89. <https://doi.org/10.1262/jrd.19124>
- Membrillo-Ortega, A., Córdova-Izquierdo, A., Hicks-Gómez, J. J., Valencia-Méndez, J. J., & Castillo-Juárez, H. (2011). Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*, 22(2), 85-90.
- Montoya, A. (2009). Esperpermograma. *Tecnología*, 153.
- Nery, I. H., Araújo Silva, R. A., Souza, H. M., Arruda, L. C., Monteiro, M. M., Seal, D. C., ... & Guerra, M. M. P. 2020. Effects of l-carnitine on equine semen quality during liquid storage. *Biopreservation and Biobanking*, 18(5), 403-408.
- Neuhauser, S., Gösele, P., & Handler, J. 2018. The effect of four different commercial semen extenders on the motility of stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 62, 8-12.
- Neuman, S. L., Lin, T. L., & Heste, P. Y. 2002. The effect of dietary carnitine on semen traits of White Leghorn roosters. *Poultry Science*, 81(4), 495-503.
- Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. 2004. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci*. 1033, 177-188
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., ... Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Ortega, A. M., Izquierdo, A. C., Gómez, J. J. H., Olivares-Corichi, I. M., Torres, V. M. M., & De Jesus Valencia Mendez, J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, 28(12).



- Ortega C. O. 2011. Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Ortega, C. (2007). Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. *Philologia Hispalensis*, 21, 97-117.
- Parks, J. E., & Graham, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.
- Pérez Osorio, J., Otero Arroyo, R., Cardona-Alvarez, J., Ospitia, P., González, A., & Paredes Cañón, A. (2018). Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 10(1), 61. <https://doi.org/10.24188/recia.v10.n1.2018.631>
- Potter, D. S., Webb, G. W., Onyango, B., & Northcutt, T. (2015). 134 L-Carnitine and pyruvate inclusion in diluents for cold-stored stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(5), 440. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.03.146>
- Potter, D. S. (2015). L-Carnitine and Pyruvate Inclusion in Diluents for Cold-Stored Stallion Spermatozoa. Master Thesis. Missouri State University. Pag.19-42.
- Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M., & Aurich, C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 C. *Reproduction in domestic animals*, 43(3), 261-266.
- Province, C. A., Squires, E. L., Pickett, B. W., & Amann, R. P. 1985. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, 23(6), 925-934.
- Pugliesi, G., Carvalho, G. R. D., Rates, D. M., Ker, P. G., Matta, M. P. D., Oliveira, R. R. D., & Silva Filho, J. M. D. 2012. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(12), 2411-2417.
- Ramsay, R. R., Gandour, R. D., & Van Der Leij, F. R. 2001. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1546(1), 21-43. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00147-9)
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2001). Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65(2), 462-470. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.2.462>
- Rathi, R., Colenbrander, B., Stout, T. A. E., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2003).



- Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 64(1), 120-128. <https://doi.org/10.1002/mrd.10216>
- Restrepo, G., Montoya, J. D., & Rojano, B. (2016). Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación de semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina. Antioxidant capacity and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved with quercetin and ergothioneine. *Revista UDCA Actualidad & Div. Cient*, 63(3), 1-25.
- Restrepo Betancur, G., Pizarro López, E., & Alberto Rojano, B. (2013). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 128-136.
- Rosa-Filho AC, Spers A, Mazza PHR, Arruda RP, Gama RD, Rossa LAF, et al. 2001. Effects of dietary Lcarnitine on reproductive parameters of Arabian stallions. *Rev Brasil Reprod Anim*. 25, 369–371.
- Sadurni, C. (2020). *Nuevos avances en tecnologías reproductivas en equinos*. 1-64.
- Samper JC. 2009. Artificial insemination with fresh and cooled semen. In: Samper JC (ed.), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd ed. St Louis, MO: Saunders Elsevier; Pag. 165–174.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano, A., Estesó, M. C., López, A., Guerra, R., ... Hildebrandt, T. B. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, 79(2), 383-391. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.10.011>
- Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. (2019). *Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos (Sperm. 27(10)*, 652-657.
- Santiani, A., Evangelista-Vargas, S., Vargas, S., Gallo, S., Ruiz, L., Orozco, V., & Rosemberg, M. 2016. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia*, 49(6), e12672.
- Santiani, A., Evangelista-Vargas, S., Vargas, S., Gallo, S., Ruiz, L., Orozco, V., Rosemberg, M., 2017. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia* 49. <https://doi.org/10.1111/and.12672>
- Serafini, R., Ghosh, S., Love, C. C., Medrano, J. M. R., Teague, S. R., LaCaze, K. A., & Varner, D. D. (2019). Effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm quality. *Theriogenology*, 139, 121-125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.004>



- Servillo, L., Giovane, A., Cautela, D., Castaldo, D., & Balestrieri, M. L. (2014). Where does Nε-trimethyllysine for the carnitine biosynthesis in mammals come from? *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084589>
- Sharma, Y., & Sharma, M. (2020). Sperm Cryopreservation: Principles and Biology. *Journal of Infertility and Reproductive Biology*, 8(3), 43-48. [https://doi.org/10.47277/jirb/8\(3\)/43](https://doi.org/10.47277/jirb/8(3)/43)
- Smorag, Z. (2002). Reproduction biotechnology of farm animals. En *Biotechnologia*.
- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B. M., & Stout, T. a E. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal reproduction science*, 107(3-4), 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.011>
- Stradaioli, G., Sylla, L., Zelli, R., Supplizi, A. V., Chiodi, P., Arduini, A., & Monaci, M. 2000. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science*, 64(3-4), 233-245.
- Swegen, A., Smith, N. D., Gibb, Z., Curry, B. J., & Aitken, R. J. (2019). The serine protease testisin is present on the surface of capacitated stallion spermatozoa and interacts with key zona pellucida binding proteins. *Andrology*, 7(2), 199-212. <https://doi.org/10.1111/andr.12569>
- Tabarez, A., Garcia, W., & Palomo, M. (2013). AIDA (2013), XV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, 288-290. *Aida*, 1, 186-188.
- Tamay, E., & Velez, F. (2018). *Efecto de la Melatonina en la criopreservacion de espermatozoides equinos*. Tesis. Universidad de Cuenca
- Terrones, A. J. N. 2004. Parámetros reproductivos del caballo peruano de paso en el criadero Lupita SA-Pachacamac (1981-1998) (No. L53 T4-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Zootecnia. Dpto. de Producción Animal. Pag. 10–30.
- Trzcińska, M., Bryła, M., Gajda, B., & Gogol, P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83(3), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.045>
- Twenter, H. M., Belk, A. D., Klohonatz, K. M., Bass, L. D., Bouma, G. J., & Bruemmer, J. E. (2017). An Investigation Into miRNAs in the Equine Epididymis as Potential Regulators of Spermatozoal Maturation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.07.023>
- Usuga, A. (2017). *Plasma seminal en el caballo criollo colombiano*.
- Van der Linden, L. de S., Bustamante-Filho, I. C., Souza, A. P. B., Lopes, T. N., da Silva, A. F. T., Tomé, L. M., ... Neves, A. P. (2020). Structural modelling of the equine protein disulphide isomerase A1 and its quantification in the epididymis and seminal plasma.



- Andrologia*, 52(3), 1-11. <https://doi.org/10.1111/and.13530>
- Vargas M. S. A. 2013. Criopreservación de semen de caballo peruano de paso utilizando Glicerol, Etilenglicol, Dimetilsulfóxido y Dimetilacetamida como agentes Crioprotectores. Tesis. Universidad Científica del Sur. Pag. 10–45.
- Varner, D. D., Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2015). Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, 47(1), 16-24. <https://doi.org/10.1111/evj.12308>
- Vidament, M., Magistrini, M., Le Foll, Y., Levillain, N., Yvon, J. M., Duchamp, G., & Blesbois, E. 2012. Temperatures from 4 to 15° C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. *Theriogenology*, 78(2), 297-307.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/rd9950871>
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell transplantation*, 30, 963689721999617. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Woelders, H., & Chaveiro, A. 2004. Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 49(3), 258-271.
- Yan, L., Liu, J., Wu, S., Zhang, S., Ji, G., & Gu, A. (2014). Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(5), 549-554. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0215-2>
- Zeyner, A., & Harmeyer, J. (1999). Metabolic functions of L-carnitine and its effects as feed additive in horses. A review. *Archives of Animal Nutrition*, 52(2), 115-138. <https://doi.org/10.1080/17450399909386157>



10. ANEXOS

Anexo 1. Valores promedios (\pm EEM) de motilidades y velocidades de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas.

Parámetros	INRA (n = 161)						UHT (n = 162)						Significancia (Valor P)			
	(T)	Control	LC-1Mm	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Dosis LC (A)	Diluyente (B)	Interacción (A X B)
MT (%)*	0h	85,1 \pm 6,40	86,1 \pm 4,55	86,8 \pm 3,63	90,3 \pm 3,40	84,5 \pm 3,34	84,3 \pm 4,21	77,5 \pm 9,75	87,1 \pm 2,97	88,5 \pm 2,62	84,8 \pm 2,44	89,6 \pm 2,48	84,4 \pm 2,36			
	48h	35,2 \pm 6,89	53,4 \pm 8,01	65,8 \pm 8,79	57,3 \pm 7,53	67,9 \pm 4,92	49,6 \pm 5,18	31,6 \pm 8,52	45,3 \pm 9,76	45,4 \pm 8,25	54,0 \pm 10,68	47,7 \pm 8,85	37,5 \pm 5,27	0,0126	0,0010	0,6394
	96h	10,0 \pm 2,89	20,3 \pm 5,36	33,3 \pm 7,94	26,0 \pm 5,55	38,6 \pm 7,74	32,9 \pm 6,99	6,7 \pm 1,33	11,7 \pm 4,41	10,1 \pm 3,19	14,6 \pm 5,42	12,6 \pm 4,88	11,4 \pm 4,41			
MP (%)*	0h	57,0 \pm 7,90	65,5 \pm 6,70	69,1 \pm 5,76	67,5 \pm 5,58	56,2 \pm 7,66	54,7 \pm 7,05	44,3 \pm 10,00	53,6 \pm 6,51	53,8 \pm 4,21	48,8 \pm 4,33	52,9 \pm 6,26	43,2 \pm 4,66			
	48h	1,9 \pm 0,74	17,1 \pm 4,64	31,1 \pm 8,82	23,9 \pm 6,36	33,0 \pm 3,04	11,7 \pm 4,02	1,2 \pm 0,85	8,3 \pm 4,59	7,6 \pm 4,74	10,6 \pm 4,54	11,5 \pm 5,84	4,6 \pm 1,90	0,012917	0,0000	0,7599
	96h	0	3,0 \pm 1,39	6,2 \pm 2,65	6,7 \pm 2,42	8,9 \pm 3,64	10,9 \pm 3,57	0,1 \pm 0,05	1,0 \pm 0,86	0,8 \pm 0,43	1,1 \pm 0,56	1,7 \pm 1,11	1,0 \pm 0,63			
VCL (μm/s)*	0h	139,9 \pm 6,93	139,2 \pm 5,15	136,4 \pm 4,02	137,5 \pm 6,00	155,1 \pm 7,75	158,3 \pm 8,36	112,2 \pm 14,46	126,4 \pm 3,50	125,8 \pm 2,69	133,9 \pm 3,78	135,2 \pm 4,22	135,1 \pm 5,01			
	48h	49,6 \pm 25,81	116,3 \pm 15,41	115,2 \pm 14,94	128,6 \pm 5,94	130,1 \pm 14,77	115,9 \pm 17,04	23,2 \pm 15,37	63,3 \pm 20,32	51,3 \pm 20,34	92,2 \pm 17,68	89,9 \pm 22,17	53,0 \pm 20,98	0,0000	0,0000	0,4522
	96h	14,3 \pm 14,30	79,5 \pm 20,02	72,1 \pm 23,38	101,3 \pm 26,83	112,3 \pm 19,70	117,5 \pm 18,35	0	27,2 \pm 18,00	38,3 \pm 19,17	13,5 \pm 13,47	25,4 \pm 16,82	27,0 \pm 17,90			
VAP (μm/s)*	0h	94,6 \pm 2,81	95,9 \pm 2,80	95,9 \pm 2,96	91,6 \pm 4,99	90,0 \pm 4,00	82,2 \pm 3,47	72,7 \pm 11,05	93,0 \pm 6,35	89,5 \pm 4,24	88,9 \pm 5,35	93,0 \pm 4,96	77,2 \pm 4,57			
	48h	21,2 \pm 10,7	64,2 \pm 9,5	71,2 \pm 11,0	72,1 \pm 5,60	61,4 \pm 8,24	57,5 \pm 9,09	11,3 \pm 7,70	34,2 \pm 10,96	27,0 \pm 11,01	46,5 \pm 9,02	38,9 \pm 12,98	21,2 \pm 8,57	0,0000	0,0000	0,1630
	96h	6,2 \pm 6,21	39,2 \pm 10,63	37,4 \pm 12,48	51,2 \pm 13,23	52,9 \pm 10,84	55,7 \pm 9,13	0	14,1 \pm 9,33	17,6 \pm 8,98	7,2 \pm 7,24	14,4 \pm 9,80	14,1 \pm 9,36			
VSL (μm/s)*	0h	80,0 \pm 2,71	82,4 \pm 2,31	82,4 \pm 2,45	79,9 \pm 3,86	79,9 \pm 4,10	73,5 \pm 3,39	62,0 \pm 9,38	80,4 \pm 4,97	75,2 \pm 3,89	76,8 \pm 4,44	76,4 \pm 4,41	68,5 \pm 4,1			
	48h	17,1 \pm 8,61	53,5 \pm 8,58	59,0 \pm 9,41	63,3 \pm 5,74	61,3 \pm 6,81	47,8 \pm 7,61	9,1 \pm 6,29	28,2 \pm 9,04	25,1 \pm 10,29	39,0 \pm 7,61	35,6 \pm 11,94	18,0 \pm 7,16	0,0000	0,0000	0,2458
	96h	5,1 \pm 5,13	31,1 \pm 8,55	27,8 \pm 9,68	42,1 \pm 10,88	49,1 \pm 9,31	47,7 \pm 7,87	0	11,1 \pm 7,37	14,3 \pm 7,37	6,0 \pm 6,01	12,4 \pm 7,72	12,7 \pm 8,43			

(T) = tiempo; (A) = Factor correspondiente a la dosis de LC; (B) = Factor correspondiente al tipo de diluyente; (A x B) = Interacción entre factores dosis de LC x tipo de diluyente. *

Asteriscos en cada parámetro expresa las diferencias significativas entre reproductores (covariable)



Anexo 2. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros de relación y progresividad de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas.

Parámetros	INRA (n = 161)						UHT (n = 162)						Significancia (Valor P)				
	(T)	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Dosis (A)	LC (B)	Diluyente (B)	Interacción (A X B)
STR (%)*	0h	84,6 \pm 0,93	87,1 \pm 1,61	85,9 \pm 0,81	81,1 \pm 4,53	87,7 \pm 0,60	86,1 \pm 0,64	71,9 \pm 10,56	85,2 \pm 0,61	84,9 \pm 0,68	86,2 \pm 0,72	86,0 \pm 0,70	81,2 \pm 4,26				
	48h	26,9 \pm 13,48	73,0 \pm 9,39	72,4 \pm 9,15	84,1 \pm 1,44	76,7 \pm 9,62	72,7 \pm 10,45	17,5 \pm 11,60	45,9 \pm 14,57	38,0 \pm 15,01	64,9 \pm 12,38	48,9 \pm 15,57	38,2 \pm 15,22	0,0001	0,0000		0,5681
	96h	9,2 \pm 9,19	52,9 \pm 13,30	44,0 \pm 13,98	54,9 \pm 13,75	64,1 \pm 12,24	74,5 \pm 10,69	0	17,2 \pm 11,44	26,9 \pm 13,45	9,1 \pm 9,09	18,7 \pm 12,44	20,0 \pm 13,2				
LIN (%)*	0h	62,1 \pm 4,51	62,1 \pm 3,48	63,1 \pm 2,91	58,4 \pm 4,18	61,0 \pm 4,74	50,0 \pm 5,84	49,7 \pm 7,57	64,0 \pm 4,43	60,9 \pm 3,04	58,0 \pm 3,93	59,5 \pm 4,22	50,7 \pm 2,86				
	48h	12,0 \pm 6,28	41,7 \pm 6,78	46,3 \pm 7,53	46,2 \pm 4,19	47,0 \pm 5,55	36,5 \pm 5,93	8,7 \pm 6,07	25,1 \pm 8,07	21,0 \pm 8,49	33,4 \pm 6,77	28,3 \pm 9,43	15,1 \pm 6,06	0,0003	0,0000		0,3924
	96h	4,0 \pm 3,99	25,9 \pm 6,97	22,8 \pm 7,66	29,1 \pm 7,54	35,0 \pm 7,19	36,1 \pm 5,60	0	8,8 \pm 5,86	12,5 \pm 6,48	5,1 \pm 5,11	12,0 \pm 8,59	10,4 \pm 6,97				
WOB (%)*	0h	70,6 \pm 4,07	71,4 \pm 4,01	73,0 \pm 3,20	69,2 \pm 4,25	63,6 \pm 5,29	54,8 \pm 3,81	58,3 \pm 8,70	74,8 \pm 5,23	72,5 \pm 3,58	66,0 \pm 4,25	66,6 \pm 5,11	59,0 \pm 3,84				
	48h	14,9 \pm 7,83	51,5 \pm 8,27	55,3 \pm 8,51	54,5 \pm 4,41	48,5 \pm 6,46	43,9 \pm 7,14	10,9 \pm 7,41	33,8 \pm 11,33	23,5 \pm 9,70	39,8 \pm 7,89	31,8 \pm 10,51	17,9 \pm 7,33	0,0002	0,0000		0,3429
	96h	4,8 \pm 4,82	32,6 \pm 8,66	28,8 \pm 9,62	35,0 \pm 8,99	41,9 \pm 8,82	42,2 \pm 6,46	0	11,3 \pm 7,49	15,4 \pm 7,88	6,1 \pm 6,10	13,7 \pm 9,48	11,6 \pm 7,72				
ALH (μm)	0h	5,1 \pm 0,49	5,1 \pm 0,48	4,9 \pm 0,38	5,0 \pm 0,46	5,8 \pm 0,59	6,6 \pm 0,47	4,3 \pm 0,60	4,2 \pm 0,40	4,6 \pm 0,29	5,5 \pm 0,71	5,2 \pm 0,42	5,5 \pm 0,31				
	48h	2,2 \pm 1,19	5,0 \pm 0,72	4,6 \pm 0,68	5,8 \pm 0,42	4,7 \pm 0,62	5,3 \pm 0,82	1,0 \pm 0,67	2,5 \pm 0,87	2,1 \pm 0,84	3,9 \pm 0,77	2,7 \pm 0,86	2,4 \pm 0,97	0,0002	0,0000		0,6166
	96h	0,8 \pm 0,80	3,5 \pm 0,92	3,0 \pm 0,97	4,2 \pm 1,18	4,3 \pm 0,84	5,2 \pm 0,80	0	1,2 \pm 0,79	1,9 \pm 0,93	0,5 \pm 0,49	1,0 \pm 0,69	1,1 \pm 0,71				
BCF (Hz)	0h	8,6 \pm 0,19	9,2 \pm 0,22	9,0 \pm 0,37	9,2 \pm 0,90	9,8 \pm 0,20	9,5 \pm 0,26	8,3 \pm 1,13	8,7 \pm 0,30	8,5 \pm 0,21	9,4 \pm 0,45	9,3 \pm 0,45	10,7 \pm 0,42				
	48h	3,2 \pm 1,92	8,2 \pm 1,21	9,1 \pm 1,59	9,7 \pm 1,12	9,2 \pm 1,46	8,0 \pm 1,44	2,7 \pm 1,89	7,4 \pm 2,56	4,8 \pm 1,92	8,9 \pm 1,78	6,8 \pm 2,19	4,1 \pm 1,87	0,0003	0,0001		0,7855
	96h	0,4 \pm 0,44	6,6 \pm 2,21	7,8 \pm 2,36	7,7 \pm 2,16	10,1 \pm 1,82	7,7 \pm 1,27	0	2,8 \pm 1,87	3,3 \pm 1,76	1,7 \pm 1,72	2,9 \pm 1,91	3,0 \pm 2,01				

(T) = tiempo; (A) = Factor correspondiente a la dosis de LC; (B) = Factor correspondiente al tipo de diluyente; (A x B) = Interacción entre factores dosis de LC x tipo de diluyente. *

Asteriscos en cada parámetro expresa diferencias significativas entre reproductores (covariable)



Anexo 3. Valores promedios (\pm EEM) de integridad de las membranas espermáticas por subcategorías y totales de muestras espermáticas de caballo diluidas con INRA y UHT y suplementadas con diferentes concentraciones crecientes (0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM) de L-carnitina (LC) y almacenadas en refrigeración durante 48 y 96 horas.

Parámetros	INRA (n = 161)						UHT (n = 162)						Significancia (Valor P)			
	(T)	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Control	LC-1mM	LC-5mM	LC-10mM	LC-25mM	LC-50mM	Dosis LC (A)	Diluyente (B)	A X B
IPIA (%)*	0h	82,7 \pm 1,45	88,3 \pm 1,59	89,0 \pm 1,00	90,0 \pm 1,61	92,7 \pm 1,76	94,4 \pm 1,15	81,7 \pm 0,17	88,7 \pm 1,42	87,3 \pm 0,88	89,3 \pm 0,73	87,0 \pm 1,36	88,3 \pm 1,30			
	48h	32,7 \pm 1,88	57,0 \pm 1,00	61,0 \pm 2,18	66,2 \pm 2,75	67,6 \pm 3,53	64,5 \pm 2,81	43,3 \pm 3,61	65,1 \pm 1,18	73,3 \pm 3,28	70,7 \pm 3,22	69,0 \pm 0,58	68,7 \pm 1,59	0,0000	0,0710	0,0198
	96h	18,4 \pm 0,72	35,8 \pm 3,40	39,9 \pm 2,10	51,3 \pm 3,09	52,7 \pm 3,17	54,1 \pm 3,89	36,2 \pm 3,57	41,3 \pm 5,81	42,7 \pm 3,56	42,3 \pm 2,77	44,2 \pm 1,40	43,7 \pm 1,18			
IPDA (%)	0h	0,3 \pm 0,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	48h	0,3 \pm 0,17	0,3 \pm 0,17	0	0,7 \pm 0,33	0,5 \pm 0,25	0	0	0	1,3 \pm 0,67	1,0 \pm 0,29	0	1,3 \pm 0,67	0,3660	0,0028	0,0280
	96h	1,0 \pm 0,50	0,7 \pm 0,33	0	0,7 \pm 0,33	0,7 \pm 0,33	0,8 \pm 0,37	2,0 \pm 0,58	0,7 \pm 0,17	2,3 \pm 0,73	1,3 \pm 0,44	1,0 \pm 0,29	1,3 \pm 0,33			
DPIA (%)*	0h	12,7 \pm 2,35	9,9 \pm 2,03	9,7 \pm 1,45	7,3 \pm 0,73	7,0 \pm 1,61	5,6 \pm 1,15	18,3 \pm 0,17	9,7 \pm 1,17	11,7 \pm 0,83	10,0 \pm 0,87	12,0 \pm 1,76	11,7 \pm 1,30			
	48h	56,3 \pm 4,34	33,7 \pm 0,83	32,0 \pm 2,36	24,4 \pm 2,33	23,4 \pm 5,44	30,5 \pm 3,29	51,3 \pm 3,88	26,6 \pm 1,16	19,3 \pm 1,45	23,3 \pm 3,56	26,0 \pm 0,50	24,0 \pm 0,87	0,0000	0,0839	0,1194
	96h	68,9 \pm 4,82	57,2 \pm 4,59	53,2 \pm 3,81	43,4 \pm 2,64	41,9 \pm 2,86	42,5 \pm 3,02	53,8 \pm 3,34	46,7 \pm 6,01	47,2 \pm 2,81	46,4 \pm 2,89	43,8 \pm 1,99	43,9 \pm 2,53			
DPDA (%)*	0h	4,3 \pm 1,30	1,7 \pm 0,45	1,3 \pm 0,67	2,7 \pm 0,88	0,3 \pm 0,17	0	0	1,7 \pm 0,44	1,0 \pm 0,29	0,7 \pm 0,17	1,0 \pm 0,50	0			
	48h	10,7 \pm 2,89	9,0 \pm 0,29	7,0 \pm 0,76	8,7 \pm 1,01	8,5 \pm 1,96	5,1 \pm 1,80	5,3 \pm 1,33	8,3 \pm 2,25	6,0 \pm 1,73	6,0 \pm 0,76	5,0 \pm 0,76	6,0 \pm 1,00	0,1422	0,7154	0,7058
	96h	11,7 \pm 3,81	6,3 \pm 2,46	6,9 \pm 1,79	4,7 \pm 2,33	4,7 \pm 2,33	2,6 \pm 1,33	8,0 \pm 2,18	11,3 \pm 0,93	7,8 \pm 1,37	10,0 \pm 3,40	11,0 \pm 2,78	11,0 \pm 2,88			
IMP (%)*	0h	83,0 \pm 1,61	88,3 \pm 1,59	89,0 \pm 1,00	90,0 \pm 1,61	92,7 \pm 1,76	94,4 \pm 1,15	81,7 \pm 0,17	88,7 \pm 1,42	87,3 \pm 0,88	89,3 \pm 0,73	87,0 \pm 1,26	88,3 \pm 1,30			
	48h	33,0 \pm 2,02	57,3 \pm 1,09	61,0 \pm 2,18	66,9 \pm 3,08	68,1 \pm 3,77	64,5 \pm 2,81	43,3 \pm 3,61	65,1 \pm 1,18	74,7 \pm 3,18	71,7 \pm 3,18	69,0 \pm 0,58	70,0 \pm 1,76	0,0000	0,0294	0,0000
	96h	19,4 \pm 1,19	36,5 \pm 3,39	39,9 \pm 2,10	52,0 \pm 2,91	53,4 \pm 3,00	54,8 \pm 2,65	38,2 \pm 3,39	42,0 \pm 5,68	45,0 \pm 3,51	43,6 \pm 2,37	45,2 \pm 1,32	45,1 \pm 1,05			
IMA (%)*	0h	95,3 \pm 1,30	98,3 \pm 0,45	98,7 \pm 0,67	97,3 \pm 0,88	99,7 \pm 0,17	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	98,3 \pm 0,44	99,0 \pm 0,29	99,3 \pm 0,17	99,0 \pm 0,50	100,0 \pm 0,00			
	48h	89,0 \pm 3,04	90,7 \pm 0,17	93,0 \pm 0,76	90,7 \pm 0,73	91,0 \pm 2,15	95,0 \pm 1,82	94,7 \pm 1,33	91,7 \pm 2,25	92,7 \pm 1,86	94,0 \pm 0,50	95,0 \pm 0,76	92,7 \pm 0,73	0,2565	0,4278	0,8352



96h 87,3 ± 4,28 93,0 ± 2,78 93,1 ± 1,79 94,7 ± 2,67 94,7 ± 2,67 96,6 ± 1,65 90,0 ± 2,75 88,0 ± 1,00 89,9 ± 1,97 88,7 ± 3,48 88,0 ± 3,01 87,7 ± 3,11

(T) = tiempo; (A) = Factor correspondiente a la dosis de LC; (B) = Factor correspondiente al tipo de diluyente; (A x B) = Interacción entre factores dosis de LC x tipo de diluyente. * Asteriscos en cada parámetro expresa diferencias significativas entre reproductores (covariable)

Anexo 4. Valores promedios (± EEM) de motilidades y velocidades de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas

Parámetros	Tratamientos (n = 92)					Significancia (Valor P)			
	(T)	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	Tiempo	Tiempo x tratamiento	Tiempo x diluyente	A x B x C
						(A)	(B)	(C)	
MT (%)	0h	89,5 ± 1,42	89,8 ± 2,31	71,1 ± 8,17	74,7 ± 5,12				
	24h	80,0 ± 4,14	86,4 ± 3,22	45,3 ± 8,10	54,3 ± 6,71	0,0000	0,3675	0,0127	0,5412
	72h	65,3 ± 7,12	59,7 ± 6,50	13,4 ± 2,31	20,1 ± 5,19				
MP (%)	0h	50,1 ± 6,49	51,5 ± 5,86	32,7 ± 7,16	33,1 ± 7,31				
	24h	47,4 ± 3,16	52,4 ± 3,67	9,5 ± 2,79	12,3 ± 2,60	0,0000	0,9821	0,0022	0,9951
	72h	32,6 ± 5,75	32,6 ± 6,67	0,6 ± 0,29	1,5 ± 0,80				
VCL (µm/s)	0h	69,1 ± 9,04	63,6 ± 6,86	71,4 ± 6,14	66,7 ± 8,33				
	24h	74,2 ± 1,51	35,1 ± 3,26	75,6 ± 2,55	39,1 ± 1,96	0,0000	0,6891	0,0000	0,7656
	72h	63,6 ± 5,80	22,8 ± 2,70	66,6 ± 8,69	21,8 ± 3,05				
VAP (µm/s)	0h	46,1 ± 5,41	47,9 ± 4,40	35,4 ± 5,09	34,8 ± 4,95				
	24h	48,8 ± 0,97	49,9 ± 1,72	18,1 ± 2,23	19,7 ± 1,37	0,0000	0,9792	0,0000	0,5833
	72h	35,9 ± 4,46	43,7 ± 6,54	9,4 ± 1,38	9,2 ± 1,75				
VSL (µm/s)	0h	33,6 ± 3,08	36,5 ± 2,54	24,0 ± 3,59	24,6 ± 3,40				
	24h	37,8 ± 0,90	37,2 ± 1,36	12,7 ± 2,12	13,9 ± 1,42	0,0000	0,8805	0,0000	0,5385
	72h	27,3 ± 3,40	31,3 ± 4,38	5,1 ± 1,02	5,2 ± 1,46				

(T) = tiempo; (A) Factor tiempo de almacenamiento; (B) = Tiempo X tratamiento de LC; (C) = Tiempo X diluyente; (A x B X C) = Interacción entre tiempo, tratamiento, diluyente.



Anexo 5. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros de relación y progresividad de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas

Parámetros	Tratamientos (n = 92)					Significancia (Valor P)			
	(T)	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	Tiempo	Tiempo x tratamiento	Tiempo x diluyente	A x B x C
						(A)	(B)	(C)	
STR (%)	0h	72,7 \pm 2,76	72,9 \pm 1,39	60,5 \pm 2,84	64,6 \pm 2,00				
	24h	71,2 \pm 1,70	71,5 \pm 1,93	57,4 \pm 3,36	60,0 \pm 3,22	0,000001	0,902855	0,049011	0,452897
	72h	66,2 \pm 3,00	68,5 \pm 3,60	48,7 \pm 1,99	46,6 \pm 4,25				
LIN (%)	0h	50,0 \pm 3,25	50,2 \pm 2,27	34,4 \pm 3,10	38,9 \pm 4,87				
	24h	48,5 \pm 1,02	47,4 \pm 2,43	29,4 \pm 2,90	30,2 \pm 1,91	0,000000	0,633606	0,338771	0,403471
	72h	35,1 \pm 2,89	41,6 \pm 3,07	18,2 \pm 1,81	18,8 \pm 3,26				
WOB (%)	0h	67,0 \pm 2,60	66,0 \pm 2,55	53,3 \pm 2,85	51,9 \pm 2,22				
	24h	67,7 \pm 2,28	66,6 \pm 2,81	48,3 \pm 1,94	48,3 \pm 1,43	0,000000	0,180624	0,343611	0,552880
	72h	51,1 \pm 2,84	58,6 \pm 3,45	36,9 \pm 1,84	38,6 \pm 2,84				
ALH (μm)	0h	2,5 \pm 0,29	2,6 \pm 0,19	2,8 \pm 0,21	3,0 \pm 0,32				
	24h	4,1 \pm 1,18	3,3 \pm 0,45	1,8 \pm 0,11	2,0 \pm 0,06	0,020646	0,758908	0,001781	0,650058
	72h	2,7 \pm 0,20	2,7 \pm 0,27	1,4 \pm 0,11	1,3 \pm 0,14				
BCF (Hz)	0h	9,3 \pm 0,68	9,2 \pm 0,51	6,6 \pm 0,68	6,5 \pm 0,37				
	24h	8,0 \pm 0,23	8,1 \pm 0,29	4,5 \pm 0,64	4,9 \pm 0,57	0,000000	0,900087	0,000007	0,532902
	72h	6,6 \pm 0,67	7,5 \pm 0,82	2,4 \pm 0,52	2,3 \pm 0,61				

(T) = tiempo; (A) Factor tiempo de almacenamiento; (B) = Tiempo X tratamiento de LC; (C) = Tiempo X diluyente; (A x B X C) = Interacción entre tiempo, tratamiento, diluyente.



Anexo 6. Valores promedios (\pm EEM) de subcategorías de estado de membrana plasmática y acrosomal de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y almacenadas en refrigeración durante 24 y 72 horas

Parámetros	Tratamientos (n = 92)					Significancia (Valor P)			
	(T)	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	Tiempo	Tiempo x tratamiento	Tiempo x diluyente	A x B x C
						(A)	(B)	(C)	
IPIA (%)	0h	74,2 \pm 2,07	83,0 \pm 1,77	61,0 \pm 3,76	76,1 \pm 3,33				
	24h	69,9 \pm 1,98	81,9 \pm 1,22	53,0 \pm 3,39	67,9 \pm 2,04	0,0000	0,7403	0,0000	0,5690
	72h	57,8 \pm 5,02	66,9 \pm 3,22	22,6 \pm 2,56	41,0 \pm 3,36				
IPDA (%)	0h	0,9 \pm 0,47	0	0	0,2 \pm 0,21				
	24h	2,1 \pm 0,30	0,8 \pm 0,16	2,0 \pm 0,19	1,7 \pm 0,18	0,0000	0,2007	0,0004	0,0660
	72h	3,0 \pm 0,38	2,3 \pm 0,37	4,5 \pm 0,63	3,3 \pm 0,18				
DPIA (%)	0h	22,2 \pm 2,37	15,1 \pm 1,70	36,5 \pm 3,68	20,9 \pm 2,52				
	24h	22,9 \pm 2,17	14,3 \pm 1,36	39,6 \pm 3,75	23,0 \pm 1,79	0,0000	0,3735	0,0000	0,6517
	72h	31,1 \pm 4,49	22,6 \pm 2,46	61,8 \pm 2,49	42,6 \pm 3,23				
DPDA (%)	0h	2,7 \pm 1,03	2,0 \pm 0,88	2,5 \pm 1,50	5,3 \pm 1,93				
	24h	5,1 \pm 1,01	3,1 \pm 0,72	5,4 \pm 1,38	7,4 \pm 0,81	0,0000	0,4687	0,0431	0,4936
	72h	8,1 \pm 0,69	8,3 \pm 1,19	11,1 \pm 1,59	13,1 \pm 1,22				
IMP (%)	0h	75,1 \pm 2,06	83,0 \pm 1,77	61,0 \pm 3,76	76,3 \pm 3,21				
	24h	72,0 \pm 2,01	82,6 \pm 1,31	55,0 \pm 3,43	69,6 \pm 2,00	0,0000	0,7184	0,0000	0,6467
	72h	60,8 \pm 4,74	69,1 \pm 3,06	27,1 \pm 2,59	44,3 \pm 3,52				
IMA (%)	0h	96,4 \pm 1,01	98,1 \pm 0,88	97,5 \pm 1,51	97,0 \pm 1,59				
	24h	92,8 \pm 0,92	96,1 \pm 0,64	92,6 \pm 1,28	90,9 \pm 0,80	0,0000	0,7492	0,0100	0,3338
	72h	88,9 \pm 0,85	89,5 \pm 1,39	84,4 \pm 1,40	83,6 \pm 1,09				

(T) = tiempo; (A) Factor tiempo de almacenamiento; (B) = Tiempo X tratamiento de LC; (C) = Tiempo X diluyente; (A x B X C) = Interacción entre tiempo, tratamiento, diluyente.



Anexo 7. Valores promedios (\pm EEM) de parámetros cinéticos registrado por el sistema CASA de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y congeladas – descongeladas.

Parámetros	Fresco – diluido				Congelado - descongelado				Valor P
	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	
MT (%)	87,3 \pm 2,75	93,3 \pm 1,88	75,6 \pm 8,17	88,6 \pm 4,17	34,2 \pm 3,75	46,6 \pm 3,44	5,6 \pm 0,73	12,9 \pm 3,63	0,0000
MP (%)	65,1 \pm 4,50	74,7 \pm 1,68	38,5 \pm 5,64	44,4 \pm 9,78	15,3 \pm 2,27	15,3 \pm 1,90	0,3 \pm 0,09	1,6 \pm 0,98	0,0000
VCL (μm/s)	136,5 \pm 2,38	137,0 \pm 3,94	137,4 \pm 7,07	140,4 \pm 6,56	105,0 \pm 7,9	117,4 \pm 2,1	0	47,3 \pm 11,7	0,0000
VAP (μm/s)	91,3 \pm 1,91	91,6 \pm 2,65	85,0 \pm 3,36	86,6 \pm 8,20	69,7 \pm 6,47	72,3 \pm 2,80	0	30,8 \pm 7,79	0,0000
VSL (μm/s)	76,6 \pm 1,91	78,6 \pm 1,52	70,4 \pm 3,15	72,5 \pm 6,14	65,3 \pm 5,81	63,2 \pm 2,63	0	28,1 \pm 7,11	0,0000
STR (%)	83,8 \pm 0,57	84,1 \pm 0,42	82,3 \pm 0,75	82,0 \pm 0,63	79,5 \pm 5,81	86,7 \pm 0,88	0	39,2 \pm 9,56	0,0000
LIN (%)	58,1 \pm 1,61	58,9 \pm 2,83	56,2 \pm 4,23	51,8 \pm 4,49	57,5 \pm 4,72	55,4 \pm 2,67	0	26,1 \pm 6,67	0,0000
WOB (%)	70,2 \pm 2,19	69,2 \pm 3,21	66,1 \pm 3,48	64,7 \pm 6,34	64,0 \pm 5,13	63,5 \pm 2,80	0	28,9 \pm 7,26	0,0000
ALH (μm)	5,1 \pm 0,19	5,1 \pm 0,33	5,2 \pm 0,39	5,5 \pm 0,54	3,5 \pm 0,32	4,5 \pm 0,25	0	1,8 \pm 0,45	0,0000
BCF (Hz)	9,5 \pm 0,36	9,6 \pm 0,23	9,6 \pm 0,39	9,7 \pm 0,48	10,7 \pm 0,90	10,7 \pm 0,51	0	5,2 \pm 1,28	0,0000



Anexo 8. Valores promedios (\pm EEM) de subcategorías del estado de las membranas espermáticas de muestras espermáticas agrupadas (pools) diluidas con INRA y UHT y suplementadas con 25 mM de L-carnitina y congeladas – descongeladas.

Parámetros	Fresco - diluido				Congelado - descongelado				Valor P
	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	INRA-Co	INRA-LC25	UHT-Co	UHT-LC25	
IPIA (%)	74,2 \pm 2,07	83,0 \pm 1,77	61,0 \pm 3,76	76,0 \pm 2,89	37,0 \pm 1,47	49,3 \pm 1,63	27 \pm 1,86	32,2 \pm 2,05	0,0000
IPDA (%)	0,9 \pm 0,47	0	0	0,2 \pm 0,19	2,0 \pm 0,37	2,1 \pm 0,36	2,0 \pm 0,45	2,0 \pm 0,40	0,9902
DPIA (%)	22,2 \pm 2,37	15,1 \pm 1,70	36,5 \pm 3,68	21,4 \pm 2,24	43,9 \pm 1,93	34,1 \pm 2,27	40,7 \pm 2,38	45,3 \pm 3,67	0,0185
DPDA (%)	2,7 \pm 1,03	1,95 \pm 0,88	2,5 \pm 1,50	4,7 \pm 1,80	17,1 \pm 1,75	14,5 \pm 1,66	30,3 \pm 2,64	21,0 \pm 2,65	0,0000
IPM (%)	75,1 \pm 2,06	83,0 \pm 1,77	61,0 \pm 3,76	76,2 \pm 2,78	39,0 \pm 1,53	51,4 \pm 1,71	28,9 \pm 1,86	34,2 \pm 1,97	0,0000
IMA (%)	96,4 \pm 1,01	98,1 \pm 0,88	97,5 \pm 1,51	97,4 \pm 1,43	80,9 \pm 1,73	83,4 \pm 1,82	67,7 \pm 2,68	77,5 \pm 2,77	0,0003

Anexo 9. Recolección de semen mediante vagina artificial (VA).



Lavado y retirado del esmegma



Sujeción de la yegua y paseo previo a la monta



Colecta seminal mediante VA

Anexo 10. Pre-dilución semen 1:1, almacenamiento y traslado al laboratorio.



Pre-dilución 1:1 de la muestra colectada



Almacenamiento y transporte de las muestras al laboratorio

Anexo 11. Procesamiento de las muestras en el laboratorio.



Preparación de las muestras en fresco para su análisis



Análisis CASA de las muestras en fresco



Preparación de cada muestra seminal con su respectivo diluyente



Preparación de cada muestra seminal con su respectivo diluyente

Anexo 12. Preparación de las dosis de L-carnitina



L-carnitina

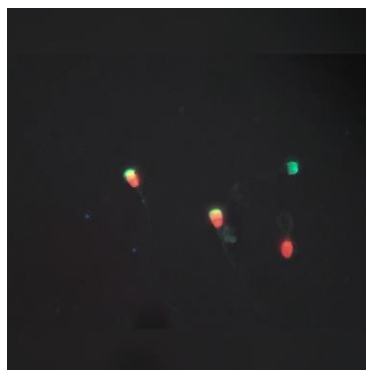


Pesaje de las dosis de L-carnitina

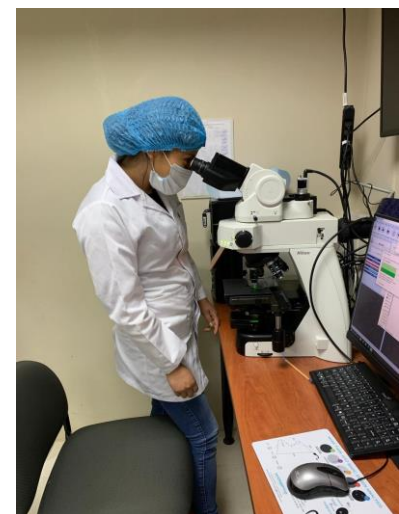
Anexo 13. Análisis de las muestras en el sistema CASA y fluorescencia



Sistema CASA



Fluorescencia



Análisis de las muestras con el microscopio de fluorescencia



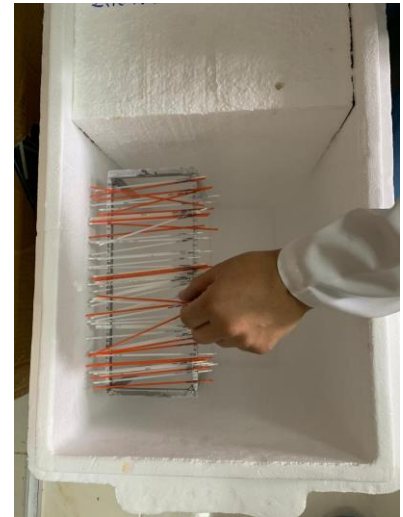
Anexo 14. Crioconservación.



Enfriamiento de las muestras



Rampa de enfriamiento



Pajuelas sobre el vapor de nitrógeno