Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con Dimetilformamida, glicerol y su combinación, mediante fecundación *in vitro* heteróloga

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

Autores:

Adriana Estefanía Sacaquirin Rivadeneira

CI: 1401311665

Correo electrónico: adrianita-esr@hotmail.com

Juan Gabriel Pillacela Zhunio

CI: 1400855555

Correo electrónico: juanpillacelaz@gmail.com

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero, PhD., Mgs., M.V.Z.

CI: 0103912846

Cuenca – Ecuador

12-diciembre-2022

RESUMEN

La fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga usando ovocitos bovinos se ha usado satisfactoriamente para evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides equinos. Por ello, esta investigación evaluó la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con DMF (5%), GLY (5%), y su combinación DMF-GLY (3%-3%) mediante FIV heteróloga. Un primer experimento descongeló muestras espermáticas equinas (DMF, n=90, GLY, n=82 y DMF-GLY, n=84) y evaluó los parámetros cinéticos e integridad de las membranas plasmática y acrosomal mediante un sistema CASA (SCA-Evolution® 2018) y la prueba de doble tinción fluorescente PI/PNA-FITC, respectivamente. Posteriormente, quince sesiones de FIV heteróloga fueron usadas en un segundo experimento para evaluar la capacidad fecundante que tuvieron los espermatozoides en unirse al ovocito, penetrarlos y formar pronúcleos. Para esto, se usó esperma equino congelado con los tres crioprotectores y ovocitos bovinos procedentes de mataderos con zona pelúcida intacta: DMF (n=258), GLY (n=214) y DMF-GLY (n=240). Los resultados demostraron la combinación de DMF-GLY fue más efectivo para proteger a los espermatozoides equinos y producir mayores valores ($P < 0,05$) de motilidad total (MT) y progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido de flagelo (BCF), e integridad de la membrana plasmática y acrosomal en comparación con el GLY. Sin embargo, la capacidad fecundante de espermatozoides equinos congelados con DMF-GLY fue similar ($P>0,05$) a la obtenida en aquellas muestras congeladas con DMF o GLY. En conclusión, La combinación de DMF-GLY fue efectiva para criopreservar espermatozoides equinos debido a sus logros obtenidos en la cinética e integridad de membranas espermáticas, pero su capacidad fecundante *in vitro* resultó similar a las obtenidas después de usar GLY o DMF. Se recomienda más estudios para validar la fertilización *in vivo* de estos agentes crioprotectores.

Palabras claves: Equino, Dimetilformamida, Glicerol, CASA, Fluorescencia, FIV heteróloga

ABSTRACT

Heterologous *in vitro* fertilization (IVF) using zona-intact bovine oocytes has been successfully used to assess the fertilizing capacity of stallion sperm. Therefore, this work evaluated the fertilizing capacity of equine spermatozoa previously frozen with DMF (5), GLY (5%), and their combination DMF-GLY (3%-3%) by heterologous IVF. In a first experiment thawed equine sperm samples (DMF, n=90, GLY, n=82 and DMF-GLY, n=84) and evaluated the kinetic parameters and integrity of the plasma and acrosomal membranes using a CASA system (SCA-Evolution® 2018) and the PI/PNA-FITC double fluorescent test, respectively. Subsequently, a heterologous IVF was used in a second experiment to evaluate the fertilizing capacity of the frozen-thawed semen measured in sperm-oocyte bound, penetration, and pronuclei formation. For this, frozen equine sperm with the three cryoprotectants and zona-intact bovine oocytes were used: DMF (n=258), GLY (n=214) and DMF-GLY (n=240) in 15 sessions. The results showed that the DMF-GLY combination was more effective in cryoprotecting equine spermatozoa and producing higher values ($P<0.05$) of total (MT) and progressive (MP) motility, curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat-cross frequency (BCF), and integrity of plasma and acrosomal membranes compared to GLY. However, the fertilizing capacity of equine spermatozoa frozen with DMF-GLY was similar ($P>0.05$) to that obtained in those samples frozen with DMF or GLY. In conclusion, the combination of DMF-GLY is effective to cryopreserve equine sperm due to achievements obtained in kinetic and integrity of sperm membranes, but its fertilizing ability was similar to that obtained after using GLY or DMF. Further studies are recommended to validate the *in vivo* fertilization of these cryoprotective agents.

Keywords: Equine, Dimethylformamide, Glycerol, CASA, Fluorescence, Heterologous IVF

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN 2

ABSTRACT 3

ÍNDICE DE TABLAS 7

ACRÓNIMOS 17

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 19

1.2. OBJETIVOS 22

1.2.1. Objetivo General 22

1.2.2. Objetivos Específicos 22

1.3. Hipótesis 22

CAPITULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA 23

2.1 Espermatogénesis 23

2.2 Anatomía del espermatozoide de semental 23

2.2.1 Cabeza 23

2.2.2 Cuello 24

2.2.3 Cola 24

2.3 Capacitación espermática 24

2.4 Fecundación *in vitro* (FIV) 25

2.4.1. Fecundación *in vitro* heteróloga en equinos 26

2.5 Criopreservación de semen de semental 27

2.6 Crioprotectores 29

2.6.1 Crioprotectores penetrantes 30

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS 32

3.1 Materiales 32

3.1.1 Materiales físicos 32

3.1.2 Materiales Biológicos 32

3.1.3 Reactivos 32

3.1.4 Materiales de Laboratorio 33

3.2.1 Área de estudio 34

3.2.2 Diseño experimental 35

3.2.3 Experimento 1 36

3.2.4 Experimento 2 39

3.3. Análisis estadístico 42

CAPÍTULO 4: RESULTADOS 43

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN 49

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES 53

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES 54

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA 55

CAPÍTULO 9: ANEXOS 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradientes de densidad de Percoll.....36

Tabla 2. Medio HEPES para fluorescencia 38

Tabla 3. Aglutinina.....38

Tabla 4. Medio MIV 40

Tabla 5. Medio PBS.....41

Tabla 6. Valores promedios (± EEM) post-descongelación de los parámetros cinemáticos de muestras congeladas con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3).....43

Tabla 7. Valores promedios ± EEM (error estándar de la media) de las subcategorías de las membranas espermáticas de muestras frescas y criopreservadas con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3). 45

Tabla 8. Capacidad fecundante expresada en la interacción espermatozoide – ovocito y tasas de penetración, polispermia y formación de pronúcleos usando esperma de caballo congelado con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3) y ovocitos bovinos. Los valores se expresan como (media ± SEM) de 15 repeticiones (número total de ovocitos o presuntos cigotos examinados = 912).....46

Tabla 9. Correlación entre variables cinemáticas y el porcentaje de formación pronuclear de los cuatro tratamientos en estudio.....48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa satelital, ubicación geográfica de la granja Irquis de la universidad de Cuenca. 34

Figura 2.Evaluación de la unión espermatozoide-ovocito, y formación pronuclear después de FIV heteróloga 47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ovarios lavados y atemperados en solución salina. 64

Anexo 2. Aspiración folicular 64

Anexo 3. Búsqueda de COC's en estereoscopio 65

Anexo 4. Selección de COC's de tipo A y B.....65

Anexo 5. Cámara de CO2 para la maduración de ovocitos bovinos 66

Anexo 6. Ovocitos en medio de maduración.....66

Anexo 7. Ovocitos maduros después de 24 horas.....67

Anexo 8. Poll de semen equino descongelado 67

Anexo 9. Columnas de concentración de Percoll más semen equino.....68

Anexo 10. Proceso de capacitación espermática.....68

Anexo 11. Cálculo de concetración espermática en la.....69

Anexo 12. Ovocitos fecundados con semen equino 69

Anexo 13. Observación de presuntos cigotos en microscopio 70

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Adriana Estefanía Sacaquirin Rivadeneira en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con Dimetilformamida, glicerol y su combinación, mediante fecundación *in vitro* heteróloga", 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, 12 de diciembre de 2022

Adriana Estefanía Sacaquirin Rivadeneira

C.I: 1401311665

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Juan Gabriel Pillacela Zhunio en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con Dimetilformamida, glicerol y su combinación, mediante fecundación in vitro heteróloga", 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, 12 de diciembre de 2022

Juan Gabriel Pillacela Zhunio

C.I: 1400855555

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Adriana Estefanía Sacaquirin Rivadeneira, autora del trabajo de titulación "Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con Dimetilformamida, glicerol y su combinación, mediante fecundación *in vitro* heteróloga", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 12 de diciembre de 2022

Adriana Estefanía Sacaquirin Rivadeneira

C.I: 1401311665

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Juan Gabriel Pillacela Zhunio, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con Dimetilformamida, glicerol y su combinación, mediante fecundación *in vitro* heteróloga", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 12 de diciembre de 2022

Juan Gabriel Pillacela Zhunio

C.I: 1400855555

DEDICATORIA

Llena de felicidad y regocijo, dedico con todo mi corazón este trabajo de titulación de tesis a mis pilares fundamentales para seguir adelante, mis padres Laura y Cornelio, pues sin su apoyo incondicional no lo habría logrado, a mis hermanos que gracias a sus consejos y palabras me han brindado la suficiente sabiduría para culminar con esta etapa universitaria.

A mi hermana Cris, has sido un gran apoyo y un ejemplo de superación, humildad, orgullo y virtudes infinitas, pues me has motivado a superarme y seguir adelante pese a los obstáculos que se han suscitado en mi vida profesional, pues en ti veo un espejo en el cual me quiero reflejar y seguir creciendo en mi vida tanto profesional como personal.

A mi novio Sebastián, tu ayuda a sido esencial en la realización de esta tesis, pues tu apoyo a sido incondicional, has estado siempre para mí en cada paso y en lo que estuviera a tu alcance.

Adriana Sacaquirin

DEDICATORIA

A mis queridos padres, Teresa y Gabriel por ser los principales promotores y pilares fundamentales de este logro conseguido gracias a su apoyo y constancia incondicional. A mis hermanos que me han acompañado y animado en este trayecto muy importante de mi vida. A mis tíos y tías que estuvieron pendientes de que este objetivo se lograra. A mis abuelos por su constante cariño y preocupación.

A mis compañeros y amigos que durante estos años hemos compartido conocimientos, tristezas y alegrías para lograr un objetivo común.

Juan

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos tener y disfrutar a nuestras familias quienes han creído en nosotros, dándonos ejemplo de superación, sacrificio y humildad, por lo que les estamos inmensamente agradecidos.

Agradecemos al Dr. Andrés Galarza por estar al frente de este trabajo de titulación y habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento. De igual manera al Dr. Xavier Samaniego y al Dr. Mauricio Dumas por la paciencia y el apoyo durante toda la ejecución de la presente investigación.

A la universidad De Cuenca por abrirnos las puertas y habernos aceptado ser parte de ella, como también agradecer a cada uno de los distinguidos docentes por su enseñanza y voluntad durante la vida universitaria.

A nuestros compañeros y amigos por formar parte de este trayecto hacia la vida profesional.

Adriana & Juan

ACRÓNIMOS

ACP: Agentes crioprotectores penetrantes

GLY: Glicerol

DMF: Dimetilformamida

MF: Metilformamida

DMA: dimetilacetamida

ZP: Zona pelúcida

FIV: Fecundación in vitro heteróloga

MIV: Maduración *in vitro*

CIV: Cultivo *in vitro*

MT: Porcentaje de motilidad total

MP: Porcentaje de motilidad progresiva

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

VAP: Velocidad promedio

LIN: Linealidad

STR: Rectitud

WOB: Oscilación

BCF: Frecuencia de batido de flagelo

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

PI: Yoduro de propidio

PNA-FITC: Aglutinina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) conjugada con isotiocianato de fluoresceína

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides equinos sigue suponiendo un hándicap tecnológico debido a las bajas tasas de criosupervivencia celular obtenidas (basada en motilidad, progresividad, vigor cinético e integridad estructural) (Graham, 1996) y, en consecuencia, a las bajas tasas de fertilidad logradas después de inseminación artificial (IA) con semen congelado – descongelado (Govaere et al., 2014). El proceso de criopreservación provoca cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides que al final se ven reflejados en una reducción de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante (Maxwell et al., 1993; Watson, 2000). De hecho, tras la criopreservación, una subpoblación espermática se degenera (su integridad estructural y funcional) y/o muere, y la otra subpoblación que sobrevive, debe mantener el vigor cinético y la capacidad fecundante para unirse a la zona pelúcida del ovocito, penetrarlo, formar pronúcleos y formar el embrión (Dell'Aquila et al., 1996).

Otros eventos deletéreos ocurren durante la criopreservación tales como la deshidratación celular, choque osmótico y estrés oxidativo (Peña et al., 2011). Estos efectos nocivos son, en cierta medida, mitigados por el efecto de los agentes crioprotectores penetrantes (ACP) que impiden que se forme cristales de hielo intracelular letal en el espermatozoide durante rango de temperatura crítico (-5 a -35ºC) o el "superenfriamiento (*supercooling*) (Mazur, 1984). Sin embargo, a más de los eventos mencionados anteriormente, durante la congelación del esperma equino existen otros factores que determina la crioresistencia tales como la raza, individuo, tipo de diluyente, ACP, protocolo de criopreservación, entre otros.

El glicerol (GLY) es el principal ACP utilizado para congelar esperma de mamíferos (Curry, 2007), incluyendo el equino (Amann and Pickett., 1987), sin embargo, muchos de sus efectos siguen sin estar claros. De hecho, se ha reportado que el GLY es nocivo cuando se agrega a los diluyentes sobre los 30ºC, así como a concentraciones superiores al 6% o inferiores al 2% (Colas, 1975). Pues altas concentraciones de GLY tienen un efecto negativo sobre la integridad de la membrana del esperma (Yotov, 2015). En la

criopreservación convencional de espermatozoides equinos, el semen se congela utilizando GLY en concentraciones que oscilan entre el 2% y 5% (Loomis & Graham, 2008). Algunas alternativas han sido exploradas para mejorar la fertilidad del semen equino criopreservado. Se han evaluado el efecto de otros ACP de bajo peso molecular en la congelación de esperma equino. Estos nuevos ACP son de bajo peso molecular y proporcionan una menor osmolaridad al medio de congelación en comparación con los medios glicerolados.

Las amidas, como la metilformamida (MF) y la dimetilformamida (DMF), son nuevos ACP que pueden penetrar con mayor facilidad las membranas espermáticas y, por lo tanto, poseen menor toxicidad osmótica (Squires et al., 2004). Además, se ha reportado que el flujo y eflujo de DMF que experimenta los espermatozoides sometidos la congelación puede ser más eficiente en la deshidratación e hidratación celular, respectivamente (Alvarenga et al., 2005).

La DMF ha sido comparado con el GLY en la criopreservación de espermatozoides equinos (Álvarez et al., 2014; Cook et al., 2019; Wu et al., 2015) obteniendo resultados muy deseables bajo condiciones *in vitro* (Vafaei et al., 2019). Usar amidas (como la dimetilacetamida, DMA) han resultado ser buenos agentes crioprotectores penetrantes para la criopreservación de semen de caballo Árabe en comparación con el GLY (Santiani et al., 2017). De la misma forma, la DMF ha demostrado tener efectos crioprotectores similares o incluso mayores al GLY con mejores porcentajes de supervivencia en espermatozoides equinos después del proceso de congelación y descongelación (Mesa et al., 2012). Del mismo modo, se han observado mejoras en motilidad espermática y porcentaje de membranas intactas post-descongelación usando 4% (v/v) de DMF (Morillo Rodriguez et al., 2012). Los porcentajes de adición de DMF que se han usado son de 1 – 5 % (v/v) en medio INRA-82® + yema de huevo (Vidament et al., 2002). El uso de 3.5% de DMF resulta beneficioso para ciertos parámetros espermáticos como movilidad total y progresiva post-descongelación, comparados con concentraciones de 2.5 y 5% (Wu et al., 2015). Del mismo modo, la combinación de 2 o más agentes crioprotectores

penetrantes puede mejorar la motilidad progresiva y viabilidad espermática. La combinación de DMF (2,5%) + GLY (2,5%) adicionados al medio INRA-96® mostró los mejores resultados en los espermatozoides epididimarios de caballo (Álvarez et al., 2014b). En el caso de la viabilidad, la combinación de GLY (2/3) + metilformamida (MF, 1/3) produjo mejores resultados de motilidad progresiva después de la congelación (Wu et al., 2015).

Para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides equinos, el uso de la fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga puede ser un procedimiento eficaz. La FIV heteróloga se ha usado exitosamente para evaluar la capacidad de los espermatozoides para fecundar ovocitos *in vitro* en diferentes especies domésticas y silvestres (Sánchez-Calabuig et al., 2015; Pradieé et al., 2018; Galarza et al., 2019). Previamente, ha sido evaluado la capacidad fecundante del semen equino congelado convencionalmente mediante el uso de una FIV heteróloga utilizando ovocitos porcinos (Balao da Silva et al., 2013) o bovinos (Sessions-Bresnahan et al., 2014; De Vasconcelos Franco et al., 2016; Al-Essawe et al., 2018; Consuegra et al., 2020). Por otro lado, la accesibilidad a ovocitos de yegua (homólogos) que sean adecuados para FIV es muy limitada. Por lo tanto, el uso de la FIV heteróloga evita esta limitación. Por lo tanto, el uso de la FIV heteróloga usando espermatozoides equinos y ovocitos bovinos madurados *in vitro* con zona pelúcida intacta puede ser una buena alternativa para evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides criopreservados con diferentes ACP.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides equinos previamente congelados con glicerol (GLY), dimetilformamida (DMF), su combinación (DMF-GLY) mediante fecundación *in vitro* heteróloga.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la cinética e integridad de membranas de espermatozoides previamente congelados con dimetilformamida, glicerol y dimetilformamida más glicerol.
- Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides congelados con DMF, GLY y DMF-GLY y sometidos a una FIV heteróloga.
- Correlacionar las características cinéticas de progresividad (Motilidad progresiva, velocidad curvilínea y velocidad lineal) frente a la fertilidad de espermatozoides congelados con DMF, GLY y DMF-GLY.

1.3. Hipótesis

La capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides equinos congelados con el 5% de Dimetilformamida o la combinación del 3% de DMF + 3% de Glicerol produce resultados iguales o mayores a los obtenidos con 5% de Glicerol.

CAPITULO 2: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis comienza cerca de la pubertad y consiste en el proceso de producción de espermatozoides a partir de células germinales primordiales, llamadas espermatogonias, presentes en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos de los testículos (Busato et al., 2017). Este proceso se puede dividir en tres fases. La primera fase, denominada espermatocitogénesis, está relacionada con la multiplicación mitótica de las espermatogonias, que se produce para la producción de espermatocitos primarios y nuevas espermatogonias (mantenimiento de la población germinativa). La segunda etapa, llamada etapa de meiosis, involucra divisiones meióticas de los espermatocitos primarios y secundarios para la producción de espermátides (haploides). La tercera etapa, o espermiogénesis, es una etapa de diferenciación en la que las espermátidas sufren un conjunto de transformaciones celulares que resultan en la formación de espermatozoides (Amann, 1981).

2.2 Anatomía del espermatozoide de semental

El espermatozoide consta de cabeza, cuello y cola. La cola es la parte más larga del espermatozoide y consta de una pieza intermedia, una pieza principal y una pieza final. La membrana plasmática, o plasmalema, rodea al espermatozoide en su totalidad y está unida firmemente al margen posterior. La longitud del espermatozoide del semental es de aproximadamente 60µm (Pesch & Bergmann, 2006).

2.2.1 Cabeza

La cabeza del espermatozoide del semental es ovalada alargada y el tercio anterior es la parte más ancha, está formada por el acrosoma, lámina postacrosomal, y el núcleo. Los dos tercios anteriores del núcleo están cubiertos por el acrosoma, que es una vesícula especializada formada por una membrana de doble capa que contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la penetración del espermatozoide en el ovocito. La lámina

postacrosomal está compuesta por laminillas estrechas y cubre la porción caudal del núcleo. El núcleo ocupa la mayor parte de la cabeza del espermatozoide y contiene el material genético en forma de ADN altamente condensado (Banaszewska et al., 2015; Brito, 2007).

2.2.2 Cuello

El cuello del espermatozoide es un segmento de unión corto entre la cabeza y la cola de 0,5 µm de longitud. Está unido anteriormente a la placa basal y posteriormente a las densas fibras externas de la cola. El cuello contiene la pieza de conexión, el centriolo proximal y varias mitocondrias pequeñas. La pieza de conexión contiene columnas segmentadas y el capitulum. El centriolo proximal está ubicado entre las principales columnas segmentadas dentro del extremo anterior de la pieza de conexión (Banaszewska et al., 2015).

2.2.3 Cola

La cola se divide en pieza intermedia, pieza principal y pieza final. El axonema se extiende por toda la longitud de la cola y está rodeado por nueve dobletes de microtúbulos a lo largo de la pieza intermedia y la pieza principal. El anillo delimita la división entre la pieza intermedia y la pieza principal. Los dobletes de axonema son las únicas estructuras observadas en la pieza final (Brito, 2007).

2.3 Capacitación espermática

La Capacitación es un término colectivo para los cambios que sufre un espermatozoide cuando entra en contacto con el tracto reproductivo femenino. Estos cambios incluyen la reorganización de las proteínas de la membrana, el metabolismo de los fosfolípidos de la membrana, la reducción de los niveles de colesterol de la membrana y la hiperactivación. Estos cambios, junto con la reacción del acrosoma (RA), son esenciales para que un espermatozoide se una y penetre en la zona pelúcida y luego se fusione con la membrana plasmática del ovocito. La capacitación es, por lo tanto, un

evento crítico en el proceso de fertilización que implica cambios en la motilidad de los espermatozoides, conocidos como hiperactivación, que se cree que ayudan a la progresión de los espermatozoides por el oviducto, al permitir que estos se alejen del epitelio oviductal y proporcionen el empuje móvil necesario para la penetración de la zona pelúcida (Rathi et al., 2001).

2.4 Fecundación *in vitro* (FIV)

En latín, *in vitro* significa "en vidrio", y la fertilización *in vitro* (FIV) se usa con frecuencia como un término general para el proceso de generación de embriones fuera del cuerpo, que también incluye la maduración in vitro (MIV) y el cultivo in vitro (CIV). Estos procedimientos se realizan en secuencia MIV-FIV-CIV para producir embriones in vitro (Hasler & Barfield, 2015). Junto con los parámetros básicos que evalúan la capacidad de fertilización de los espermatozoides, la *fecundación in vitro* es un indicador competente que proporciona información sobre la interacción de los gametos, la penetración de los espermatozoides, la formación pronuclear y el desarrollo temprano del embrión (Brahmkshtri et al., 1999).

A diferencia de otras especies de mamíferos, la fecundación *in vitro* convencional (FIV) con gametos equinos no está tan avanzada. La aparente incapacidad de los espermatozoides para penetrar la zona pelúcida *in vitro* es, probablemente, debida a la capacitación incompleta de los espermatozoides debido a medios inadecuados. In vitro pueden ser fecundados, lo que a su vez sugiere que la capacitación equina o los medios de fecundación carecen de uno o más de los factores oviductales requeridos para que los espermatozoides penetren en la zona pelúcida y entren en el ovocito. *In vivo*, el oviducto y sus secreciones proporcionan un microambiente que respalda y regula de manera confiable la interacción entre los gametos (Sadurní, 2020).

La FIV involucra una serie de eventos complejos. Una fase clave del proceso es la unión del espermatozoide a la cubierta del óvulo, llamada zona pelúcida (ZP) que se refiere a una matriz extracelular formada alrededor del ovocito de los mamíferos. Las

características morfológicas de la ZP equina se han evaluado con microscopio electrónico y se ha observado que cuando está madura su espesor es de 7 a 10 micras, lo que permite compararla con la ZP del cerdo o vaca (Chávez, 2013).

2.4.1. Fecundación *in vitro* heteróloga en equinos

La Fecundación *in vitro* es una técnica que se usa para evaluar la capacidad fecundante de semen equino criopreservado (McPartlin et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de las vacas, es difícil acceder a diversos ovarios de yegua recolectados en matadero. Por lo tanto, esto implicaría usar otra fuente de ovocitos para desarrollar estas pruebas de fertilidad. La capacidad de fertilización del semen de equino congelado y descongelado se ha evaluado con éxito mediante *fecundación in vitro* homóloga utilizando ovocitos de yegua (McPartlin et al., 2009) o *fecundación in vitro* heteróloga que incluye ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta (De Vasconcelos Franco et al., 2016). Considerando que la accesibilidad a ovocitos homólogos (de yegua) es escasa, el uso de *fecundación in vitro* heteróloga evita esta limitación y es una alternativa útil para evaluar la capacidad fecundante de esperma equino criopreservado.

Las tasas de FIV en equinos son bajas, la poliespermia es insuficiente y la zona pelúcida (ZP) se endurece por liberación prematura de gránulos corticales. Esto ha motivado el desarrollo de interacciones espermatozoide-ovocito heterólogas y se han descrito diferentes casos de interacción heteróloga entre espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina (Yanagimachi, 1994).

La fecundación heteróloga (entre gametos de diferentes especies) utilizando gametos procedentes de animales de producción es utilizada para el estudio de la calidad espermática de especies de animales salvajes y /o en peligro de extinción. Este método se ha realizado con éxito para evaluar la capacidad de los espermatozoides para fecundar ovocitos *in vitro* en diferentes especies, incluyendo ciervos, cabras salvajes, ovejas y delfines. En bóvidos es a menudo utilizada por lo que se ha sugerido que existe una escasa especificidad de especie (Yanagimachi, 1994).

El fracaso de la *fecundación in vitro* equina es probablemente atribuible al nivel de maduración inadecuada de los ovocitos o a la capacitación incompleta de los espermatozoides, resultando en la incapacidad de los espermatozoides para penetrar en la zona pelúcida. Al respecto, Tremoleda et al. en (2003) encontraron que, si bien las condiciones de fecundación *in vitro* equina apoyaban la unión de los espermatozoides de los sementales a la zona pelúcida, no lograban inducir la reacción del acrosoma ni las características típicas de la capacitación. La utilización de un medio capacitador definido para respaldar la fecundación *in vitro* equina exitosa dependerá del estudio de los desencadenantes de dicha capacitación espermática presentes en el oviducto de la yegua que puedan ser reemplazados por un medio que simule la naturalidad (Leemans et al., 2016).

2.5 Criopreservación de semen de semental

La crioconservación es actualmente el único método viable para almacenar espermatozoides por períodos de tiempo indefinidos. Sin embargo, el proceso de crioconservación y descongelación reduce la integridad acrosomal, la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides en todas las especies examinadas, incluido el caballo (Alvarenga et al., 2016). Durante el enfriamiento por debajo de 0°C, comienzan a formarse cristales de hielo extracelulares. Este cambio de fase provoca un gran aumento en la osmolaridad de cualquier líquido remanente al que estén expuestos los espermatozoides. Además, los crioprotectores hacen que el criodiluyente sea hiperosmótico, lo que provoca la deshidratación de las células por ósmosis. Si bien esta deshidratación es esencial para mantener la viabilidad posterior a la descongelación, la hiperosmolaridad extrema induce estrés celular a medida que el agua atraviesa la membrana del esperma a través de los canales de agua en un intento de equilibrar la osmolaridad. Aunque el glicerol es uno de los crioprotectores más utilizados para la crioconservación de espermatozoides de semental, esta molécula atraviesa las membranas espermáticas con relativa lentitud en comparación con otras moléculas crioprotectoras de menor peso molecular, como las amidas, el dimetilsulfóxido o el

etilenglicol (Alvarenga et al., 2005). Se ha descubierto que las amidas mejoran tanto los parámetros posteriores a la descongelación in vitro como la fertilidad de los espermatozoides de sementales con "poca capacidad de congelación". Esta mejora de la funcionalidad posterior a la descongelación indica que las amidas, y en particular la dimetilformamida, deben usarse como una alternativa al glicerol para muchos, si no todos, los procedimientos de criopreservación de esperma (Gibb & Aitken, 2016)

La criopreservación de semen de semental no ha alcanzado el nivel de eficiencia y resultados positivos descritos en otras especies. Esto se debe principalmente a la mayor sensibilidad de los espermatozoides sementales al proceso de congelación-descongelación, ya que se requiere una detención completa de los procesos metabólicos y de desarrollo dentro de los espermatozoides, es decir, las células deben mantenerse en un estado de "animación suspendida" hasta que se requieran para la fertilización (Pesch & Bergmann, 2006). Esto desata mayores tasas de estrés oxidativo y daño de la membrana plasmática, lo que desencadena la activación de varias vías de daño celular que finalmente reducen su capacidad de supervivencia y fecundación (Contreras et al., 2020).

El daño por congelación tiene especialmente dos componentes, el daño directo de los cristales de hielo y el daño secundario causado por el aumento en la concentración de solutos a medida que se forma progresivamente más hielo (Pesch & Bergmann, 2006). El estrés provocado por la formación de cristales de hielo se asocia principalmente con los cambios de presión osmótica que acompañan a la parte no congelada. La congelación intracelular debe evitarse mediante la congelación lenta porque provoca la muerte celular.

Un crioprotector como el glicerol es una necesidad indispensable para la ultra congelación del semen, porque actúa principalmente reduciendo la cantidad de hielo que se forma a cualquier temperatura bajo cero (Pesch & Bergmann, 2006).

El uso de semen de semental congelado minimiza la propagación de enfermedades, elimina barreras geográficas y preserva el material genético del animal por tiempo

ilimitado. Durante la última década se ha logrado un progreso significativo en el proceso de semen de semental congelado y descongelado y, en consecuencia, en la fertilidad. El progreso se ha asociado con (a) el uso de nuevas técnicas de inseminación artificial (b) el uso de otros crioprotectores además del glicerol y los nuevos diluyentes comercialmente disponibles que dan como resultado una mejor criosupervivencia de los espermatozoides, y (c) técnicas de selección de esperma para aumentar la calidad del semen congelado (Alvarenga et al., 2016). A pesar de esto a criopreservación de semen de semental no ha alcanzado el nivel de eficiencia y resultados positivos descritos en otras especies. Esto se debe principalmente a la mayor sensibilidad de los espermatozoides sementales al proceso de congelación-descongelación, que expones a los espermatozoides a una serie de condiciones que reducen su capacidad de supervivencia y fecundación mostrando mayores tasas de estrés oxidativo, formación de cristales de hielo y daño en el ADN, condiciones que desencadenan cambios en la membrana plasmática, fosforilación temprana de residuos de tirosina, peroxidación lipídica, motilidad progresiva baja y finalmente fertilidad reducida. (Contreras et al., 2020).

2.6 Crioprotectores

En términos generales, los diluyentes que se utilizan para congelar el semen están compuestos por sustancias que estabilizan el pH y neutraliza los productos tóxicos producidos por el metabolismo espermático, los protege del choque térmico, mantiene el equilibrio osmótico y electrolítico, inhiben el crecimiento bacteriano y aportan energía. Además, el diluyente también debe contener crioprotector para evitar la formación de cristales intra y extracelulares (Sadurní, 2020).

Los agentes criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad las cuales disminuyen el punto eutéctico de una solución, la disminución de este punto quiere decir que se alcanzará una concentración de solutos a una temperatura menor, de modo que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila-Portillo et al., 2006).

2.6.1 Crioprotectores penetrantes

Bioquímicamente se pueden distinguir tres tipos de agentes criopreservantes los azucares, alcoholes y el dimetilsulfóxido (Sevilla, n.d.). No obstante también se pueden clasificar en agentes penetrantes y no penetrantes y como intracelulares o extracelulares (Ávila-Portillo et al., 2006). Los crioprotectores intracelulares actúan a través de su capacidad para unirse al agua o sus propiedades coligativas. Los agentes extracelulares protegen los espermatozoides mediante efectos osmóticos para crear un entorno hipertónico que induce el movimiento del agua fuera de las células, deshidratando los espermatozoides y reduciendo las posibilidades de que se formen cristales de hielo dentro de las células. Por lo tanto, se evita el daño a los espermatozoides causado por la formación de hielo. Los crioprotectores no penetrantes son eficaces para proteger los espermatozoides durante la congelación sin penetración (Alvarenga et al., 2016)**.**

2.6.1.1 Dimetilformamida

Las amidas y entre estas la DMF es un eficaz crioprotector y una alternativa al Glicerol particularmente para reproductores que se clasifican como “Poor Freezers” debido al efecto sobre sus espermatozoides. Este crioprotector posee un menor peso molecular de entre (73,09 gr/mol) lo que facilita su paso a través de la membrana plasmática, permitiendo un equilibrio extra e intracelular más rápido y consecuentemente un choque osmótico menor (Gibb et al., 2013).

Hablar de la concentración óptima de DMF es un punto que todavía está en debate, ya que existen escasas investigaciones sobre este tema. Varios artículos indican que concentraciones de entre 2.5 y 5% proporcionan un aumento en la motilidad y en la integridad de la membrana post descongelación. (Álvarez et al., 2014; Medeiros et al., 2002; ZURITA, 2019).

Concentraciones elevadas de DMF pueden ser toxicas para el espermatozoide. Es así que concentraciones de 1 a 3.5% permiten obtener mejores rangos de viabilidad

espermática, potencial de membrana mitocondrial que con concentraciones de 7% (W. Contreras & Santiani, 2020).

2.6.1.2 Glicerol

Es un agente criopreservante que penetra libremente a la célula, es un alcohol con un peso molecular de 92.094 Daltons. El glicerol es el crioprotector esencial en todos los diluyentes de congelación convencionales para espermatozoides equinos. Se utiliza en concentraciones de 2,5 a 6% (Vidament et al., 2002).

El glicerol penetra en la membrana celular por difusión pasiva y permanece en la membrana y el citoplasma. Aunque estas sustancias atraviesan la membrana celular hasta que se alcanza el equilibrio, el movimiento del agua se produce más rápidamente y provoca la deshidratación celular, también mejora la cantidad de agua (intra y extracelular) no congelada y disminuir la concentración de sales. (Rica, 2012). Además, puede ejercer una acción directa sobre la membrana celular, donde se une a los grupos de la cabeza de los fosfolípidos y proteínas reduciendo la fluidez de la membrana (Alvarenga et al., 2016; Amann & Pickett, 1987). A pesar de las ventajas que posee, su uso como crioprotector para la congelación de semen de semental podría ser un factor involucrado en las bajas tasas de motilidad y fertilidad posteriores a la descongelación. La toxicidad del glicerol se debe en parte al estrés osmótico, porque el glicerol atraviesa la membrana celular más lentamente que otros crioprotectores (Alvarenga et al., 2005).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales físicos

- Guantes de examinación (látex)
- Mascarillas
- Tijeras
- Jeringas de 10 mL
- Agujas N° 18 x 1 ½ pulgadas
- Rollo de papel secante
- Rollo de papel aluminio
- Tubos Falcon de 15 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5ml
- Parafilm®-M (Ref: P7793, Sigma-Aldrich)

3.1.2 Materiales Biológicos

- Pajuelas de semen equino
- Pajuelas de semen bovino
- Ovarios bovinos

3.1.3 Reactivos

- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicilina G-sódica en sal (Sigma, P3032)
- Estreptomicina sulfato en sal (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma, G9012)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)

- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- PNA-FITC, (Sigma L7381)
- Albúmina sérica bovina, BSA (Sigma, A9418)
- Hoechst 33342
- Nitrógeno Líquido (NL_2)
- Percoll (Sigma, P1644)
- Medio para maduración *in vitro* - MIV (TCM-199, EPG y FCS)
- Medio para fecundación *in vitro* – FIV (FERT-TALP, 25 mM Bicarbonato de sodio, 22 mM lactato de sodio, 1 mM piruvato de sodio, 6 mg/mLBSA libre de ácidos grasos, y 10 μg/mL heparina)

3.1.4 Materiales de Laboratorio

- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution 2018®, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast, excitación: 450-490 nm, y emisión: 520 nm)
- Microscopio de Epifluorescencia con contraste de fases.
- Estereoscopio
- Pipetas de 1 – 10 μl, 2 – 20 μl; 20 – 200 μl, y de 200 a 1000 μl
- Placas Petri Nunc™ IVF de 35 x 10 mm
- Cajas Petri de búsqueda
- Filtros de 0,22 μm
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubreobjetos
- Nevera
- Pajuelas 0,5 ml
- Esterilizador UV

- Tanque de nitrógeno líquido
- Baño María
- Incubadora Memmert

3.2 Metodología

3.2.1 Área de estudio

Figura 1. Mapa satelital, ubicación geográfica de la granja Irquis de la universidad de Cuenca. **Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, (2020).

3.2.1.1 Ubicación geográfica

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicado en la granja Irquis en la parroquia Victoria del Portete a 22 km de la ciudad de Cuenca (Figura 1). La granja cuenta con una altitud de 2796 msnm, y su precipitación anual es de 2500 mm, con temperatura que oscila entre 3 a 11ºC.

3.2.2 Diseño experimental

La presente investigación evaluó el efecto crioprotector de DMF, GLY y su combinación DMF-GLY; sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides equinos criopreservados. Se consideró como unidad experimental las pajuelas de semen de caballo árabe con un volumen de 0,5 ml, estas fueron previamente congeladas con tres tipos de agentes crioprotectores penetrantes, de tal manera que se conformó 3 tratamientos independientes.

- T1 = DMF al 5% (n= 90 pajuelas)
- T2 = GLY al 5% (n= 81 pajuelas)
- T3 = DMF-GLY al 3% - 3% (n= 84 pajuelas)

Las pajuelas criopreservadas fueron provenientes de un experimento previo que resultó de 24 eyaculados de semen recolectados de 4 caballos Árabes en 6 sesiones. Un total de 255 pajuelas de los tres tratamientos fueron descongeladas. Asimismo, se evaluó la calidad espermática basada en motilidad e integridad de membranas (plasmática y acrosomal) y su capacidad fecundante basada en una FIV heteróloga usando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta y esperma equino. La calidad espermática se valoró en pajuelas individuales proveniente de cada tratamiento y caballo (T1 [n=90], T2 [n=81] y T3 [n=84]).

La capacidad fecundante se analizó en un total de 16 sesiones de FIV heteróloga (5 sesiones por tratamiento). En cada sesión de FIV se descongelaron 4 pajuelas por tratamiento, proveniente de los 4 caballos y se realizó una agrupación (pool). Un total de 60 pajuelas fueron usadas en esta evaluación en los tres tratamientos (T1, n=20; T2, n=20; y T3, n=20). Cada pool de cada tratamiento se sometió a un proceso de selección espermática con gradientes de densidad de Percoll (tabla 1).

La capacidad fecundante se evaluó en la capacidad de los espermatozoides de unirse a los ovocitos, penetrar y, formar pronúcleos.

Tabla 1. *Gradientes de densidad de Percoll*

Reactivo	Concentración
Cloruro de Sodio	100 mM
Cloruro de Potasio	3,2 mM
Fosfato de Sodio Monobásico	0,3 mM
DL-Lactato de Sodio	21,5 mM
Cloruro de Calcio Dihidratado	2 mM
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	0,4 mM
Hepes Acid Free	10 mM
Bicarbonato de Sodio	25 mM
Suplemento:	
BSA	6 mg/ml
Piruvato de Sodio	1 Mm
Gentamicina	50 µ/ml

3.2.3 Experimento 1

3.2.3.1 Descongelación de pajuelas

Se descongeló el esperma de 4 caballos árabes adultos previamente criopreservados en 6 sesiones, y se analizó su cinética espermática e integridad de membranas. Estas pajuelas fueron congeladas en tres tratamientos (T1, T2 y T3) con cada agente crioprotector asignado: 5% DMF, 5% de GLY, y 3%GLY + 3%DMF, respectivamente. El medio de criopreservación usado fue Botusemen-Gold y la concentración final de cada pajuela de 0,5 ml fue de 30 x 10^6 espermatozoides/ml. La técnica de congelación usado fue mediante vapores de NL_2 estático contenido dentro de la Unidad congeladora Minitube® la cual consta de una caja externa de material aislante de poliestireno, una caja interna de acero inoxidable y una rampa flotante. Para la congelación se usó la rampa flotante sobre el nivel del NL_2. Las pajuelas se colocaron en dicha rampa de manera horizontal a una altura de 5 cm del nivel del NL_2 durante 10 minutos y finalmente, las pajuelas se sumergieron dentro del NL_2.

La descongelación se efectuó a partir de los 3 meses de almacenamiento y se realizó sumergiendo las pajuelas en un baño maría a 37ºC durante 30 segundos. Las muestras congeladas – descongeladas de cada tratamiento fueron evaluadas tanto la cinética como la integridad de las membranas espermáticas.

3.2.3.2 Análisis de calidad espermática

3.2.3.2.1 Cinética espermática

Las características cinéticas de las muestras de esperma descongelado de cada tratamiento fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.l., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluaron un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Para la evaluación se tomó 5 μL de la muestra a analizar y se colocó en un portaobjetos y cubreobjetos. Las variables cinéticas evaluadas fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad promedio (VAP, µm/s), Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm).

3.2.3.2.2 Integridad de membranas espermáticas

Para la evaluación de las membranas, se descongeló una dosis del medio Hepes (250 μL) (Tabla 2). Se preparó la tinción de fluorescencia mezclando una dosis de 100 μL de yoduro de propidio (PI) más una dosis de 100 μL de PNA-FITC aglutinina (Tabla 3) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta ser usada. Al medio Hepes descongelado - temperado a temperatura ambiente se adicionó la muestra de esperma a analizar alcanzando una concentración de 10 $x10^6$ espermatozoides/mL.

Tabla 2. 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 µL en tubos eppendorf y congelar a -20 ºC hasta su uso.

Tabla 3. Aglutinina

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

Alicuotar en dosis de 50 uL y almacenar a -20ºC.

Sin luz, se agregó 5 µL de la mezcla de fluorescencia (PI / PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 µL de esa muestra y se colocó en un portaobjetos y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia (Galarza et al., 2018). La viabilidad de los espermatozoides y el estado de la membrana acrosómica se analizaron mediante microscopía de fluorescencia contando 200 células, utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.). Con la prueba de doble fluorescencia simultánea PI / FITC-PNA obtuvimos porcentajes de esperma con: membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %); y con membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA, %). Adicionalmente, con estas subcategorías se determinaron los porcentajes de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra,

equivalente a viabilidad (IMP = IPIA + IPDA) y con membrana acrosomal íntegro (IMA = IPIA + DPIA).

3.2.4 Experimento 2

3.2.4.1 Evaluación de la capacidad fecundante

La evaluación de la capacidad fecundante se cumplió siguiendo los protocolos detallados por De Vasconcelos et al. (2016) con algunas modificaciones. Para esto se empleó una fecundación *in vitro* heteróloga (FIV) usando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta y células de la granulosa intacta y espermatozoides equinos congelados con dos agentes crioprotectores penetrantes y su combinación: DMF (T1), GLY (T2) y DMF-GLY (T3).

Para este propósito se recolectaron ovarios de vacas sacrificadas en el camal municipal de la ciudad de Cuenca "EMURPLAG" y se almacenaron en solución fisiológica (con gentamicina) atemperada a 37 ºC. Estos ovarios fueron transportados al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca en un lapso menor a 2 horas. En el laboratorio los ovarios fueron lavados con solución salina atemperada a 37ºC y se procedió a la recuperación de ovocitos mediante punción folicular usando una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 18 x 1 ½ pulgadas.

La maduración *in vitro* (MIV) de complejo cúmulo-ovocito (COC) bovinos provenientes de ovarios recuperados de matadero, fueron realizadas en gotas de 60 μl (30 COC por gota) de medio de maduración TCM-199 suplementado con 10 ng/mL de EGF, 25 μg/mL FHS (Folltropin), 1 μg/mL de Estradiol, cisteamina 100 mM, y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS) (Tabla 4), durante 24 horas a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 y máxima humedad (92%). Este procedimiento se efectuó en una cámara de CO_2, Memmert® (ICO105).

Tabla 4. Medio MIV

Reactivo	Cantidad
TCM-199 + 10 ng /mL EGF + 10% (v/v) FCS	Cantidad a requerir
Bicarbonato de sodio	2,2 mg/mL
L-Glutamina	0,1 mg/mL
Rh-FSH	0,01 UI/mL
Estradiol	1μg/mL
Cisteamina	100 μM
Gentamicina	50 μg/mL

EGF = Epidermal growth factor; FCS = fetal calf serum

Después de 24 horas, los ovocitos maduros fueron lavados dos veces en medio de fertilización “FERT” (medio FERT-TALP suplementado con bicarbonato 25 mM, lactato sódico 22 mM, piruvato sódico 1 mM, BSA libre de ácidos grasos 6 mg/mL y heparina 10 μg/mL y 2 mM de cafeína) y se transfirieron a gotas de 30 μL de medio FERT (30 COC por gota).

Para la FIV heteróloga, se realizó un pool de muestras de semen equino (de 4 caballos / tratamiento) de cada tratamiento (T1, T2 y T3) más un grupo control utilizando esperma congelado-descongelado de un solo toro (pajuela comercial) de fertilidad probada.

Los espermatozoides agrupados móviles de cada tratamiento se seleccionaron mediante centrifugación en gradiente de densidad BoviPure® (Nidacon International, Suecia) antes de la FIV heteróloga. Los gradientes de densidad fueron realizados para cada tratamiento en tubos Eppendorf de 1,5 mL colocando el gradiente de BoviPure al 80% al fondo del tubo, luego el gradiente de BoviPure al 40% y finalmente en la parte superior (sobre el gradiente de 40%) se colocó 250 µL de semen descongelado. Estos gradientes se centrifugaron a 300 x g (gravedades) durante 20 minutos. El pellet recogido se suspendió en 1 mL de medio FERT y se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 100 μL de medio FERT y mantenido durante 15 minutos antes de la inseminación. Durante este tiempo, los espermatozoides experimentarán la capacitación espermática por interacción de la heparina. Para la FIV,

los espermatozoides seleccionados y capacitados se diluyeron finalmente en medio FERT a una concentración de 2 x 10^6 espermatozoides/mL y de esa dilución se agregará 30 μL cada gota de fertilización para obtener una concentración final de 1 x10^6 espermatozoides/mL. En cada réplica de FIV se probó los tres grupos heterólogos y un grupo de control homólogo (esperma bovino). Se inseminaron aproximadamente 200 COC's madurados *in vitro* por cada tratamiento incluyendo el grupo homólogo repartidos en varias sesiones. La cantidad de ovocitos de cada sesión fue repartida en 4 partes iguales (3 grupos heterólogos y 1 homólogo). Un total de 15 sesiones de FIV fueron realizadas en este experimento. Los gametos (espermatozoides y óvulos) se incubaron conjuntamente a 38,5 °C en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire con humedad máxima (92%).

La interacción espermatozoide-ovocito se evaluó mediante un ensayo de unión espermatozoide-zona pelúcida (Sperm-bound). Para ello, los ovocitos puestos en 2 mL de PBS (Tabla 5) previamente atemperado a 38,5ºC se agitaron con vórtex durante 3 minutos, se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33342 para contar el número de espermatozoides que permanecieron unidos a la zona pelúcida mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (UV 2E/C: 340-380 nm, emisión: 435-485 nm). La penetración de los espermatozoides, la poliespermia y la formación de pronúcleos se evaluó a las 24 horas post-inseminación.

Tabla 5. Medio PBS

Reactivo	Cantidad
NaCl	800 mg
KCl	20 mg
$CaCl_2$ $2H_2O$	10 ml
$MgCl_2$ $7H_2O$	10 mg
KH_2PO_4	20 mg
Na_2HPO_4 $7H_2O$	201,6 mg
Glucosa	200 mg
Agua milli-Q	100 ml

Osmolaridad: 280 mOsmol/kg. pH=7,3

3.3. Análisis estadístico

Los datos recolectados en el laboratorio se tabularon en una base en Excel y posteriormente se analizaron estadísticamente en el software STATISTICA *versión 12.0*. Los datos están expresados en media ± EEM (error estándar de la media). Cada variable numérica se sometió a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos. Los datos porcentuales o numéricos que no cumplieron una distribución normal fueron convertidos a *Arcoseno o Log-10*, respectivamente, previo a su análisis estadístico.

Un ANOVA unidireccional utilizando un GLM (modelo lineal general) fue usado para evaluar el efecto de los crioprotectores sobre la calidad espermática y capacidad fecundante en cada una de sus variables de salida. En el análisis de la cinética espermática e integridad de membranas se incluyó el factor individuo (macho) como covariable debido a la posible variabilidad entre algunos reproductores. Cuando ANOVA demostró un efecto significativo, se usó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para el análisis de correlación entre los parámetros de progresividad como MT, MP, VCL y VSL, STR y LIN y la capacidad fecundante (formación de pronúcleos) se usó una prueba de Pearson. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de $P < 0.05$.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1. Cinemática espermática

En general, los valores de los parámetros cinemáticos fueron afectados por el proceso de criopreservación, mostrando una reducción significativa (P < 0,05) en comparación con sus contrapartes frescos

Tabla 6. Valores promedios (± EEM) post-descongelación de los parámetros cinemáticos de muestras congeladas con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3).

Parámetros cinemáticos	**T1 DMF** (n=90)	**T2 GLY** (n=81)	**T3 DMF-GLY** (n=84)
MT (%)	53,2 ± 1,80[a]	41,4 ± 2,35[b]	54,2 ± 2,25[a]
MP (%)	25,1 ± 1,42[a]	16,1 ± 1,50[b]	28,4 ± 1,76[a]
VCL (µm/s)	54,0 ± 1,58[a]	42,0 ± 1,60[b]	58,0 ± 1,71[a]
VAP (µm/s)	31,1 ± 0,92[b]	28,8 ± 1,12[b]	37,3 ± 1,13[a]
VSL (µm/s)	24,5 ± 0,73[b]	24,0 ± 1,00[b]	29,9 ± 0,90[a]
STR (%)	71,6 ± 0,74	71,1 ± 0,98	72,8 ± 0,78
LIN (%)	43,1 ± 0,88[b]	49,0 ± 1,20[a]	48,2 ± 0,99[a]
WOB (%)	56,3 ± 0,77[b]	62,6 ± 1,02[a]	61,7 ± 0,87[a]
ALH (µm)	2,3 ± 0,06[a]	1,7 ± 0,05[b]	2,25 ± 0,05[a]
BCF (Hz)	8,5 ± 0,20[a]	6,4 ± 0,22[b]	8,4 ± 0,22[a]

MT, motilidad total; MP, motilidad progresiva; VCL, velocidad curvilínea; VAP, velocidad promedio; VSL, velocidad rectilínea; STR, rectitud; LIN, linealidad; WOB, oscilación; ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF, frecuencia de batida de flagelo. Diferentes superíndices en cada fila de cada parámetro muestran diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas y congeladas – descongelas ([a-b] P < 0,05).

Después del proceso de congelación – descongelación, los valores de MT, MP, VCL, ALH y BCF de los tratamientos T3 y T1 fueron más altos (P < 0,05) en comparación con el tratamiento T2. Eficientemente, las muestras congeladas – descongeladas del tratamiento T3 mostraron valores más altos (P < 0,05) de VSL y VAP comparados con aquellas muestras congeladas con los tratamientos T1 y T2. El porcentaje de STR

incrementó (P<0,001) después de la criopreservación en todos los tratamientos sin evidenciar diferencias significativas entre tratamientos. El porcentaje de LIN, sin embargo, sólo incrementó con el tratamiento T3 después de la congelación. Además, los porcentajes de LIN y WOB de muestras congeladas – descongeladas de los tratamientos T2 y T3 fueron mayores (P<0,001) en comparación con T1.

4.2. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal

Con respecto al análisis de los porcentajes de las distintas subcategorías de integridad de membranas espermáticas (evaluados con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC), todas las subcategorías de integridad de membrana plasmática fueron afectadas por los mismos efectos deletéreos de la criopreservación. La subcategoría IPIA redujo (P < 0,05) sus porcentajes independientemente del tipo de tratamiento; y por otro lado, las subcategorías IPDA, DPIA y DPDA incrementaron significativamente (P < 0,05) sus porcentajes indeseables después del proceso de congelación – descongelación.

El porcentaje de IPIA post-descongelación fue mayor (P < 0,001) en las muestras congeladas con los tratamientos T3 y T1 en comparación con el tratamiento T2. En esta misma tendencia, los porcentajes de las otras subcategorías indeseables DPIA y DPDA posterior a la descongelación fueron menores (P < 0,05) en los tratamientos T3 y T1 comparados con los porcentajes de tratamiento T2 (Tabla 3).

Tabla 7. Valores promedios ± EEM (error estándar de la media) de las subcategorías de las membranas espermáticas de muestras frescas y criopreservadas con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3).

Parámetros de fluorescencia	**T1 DMF** (n=90)	**T2 GLY** (n=81)	**T3 DMF-GLY** (n=84)
IPIA (%)	49,6 ± 0,94[a]	38,6 ± 0,98[b]	55,0 ± 1,07[a]
IPDA (%)	3,0 ± 0,31[a]	3,9 ± 0,33[a]	3,0 ± 0,28[a]
DPIA (%)	43,7 ± 1,24[b]	52,7 ± 1,34[a]	39,8 ± 1,26[b]
DPDA (%)	3,7 ± 0,48a[b]	5,0 ± 0,43[a]	3,2 ± 0,23[b]
IMP (%)	52,6 ± 0,99[b]	42,5 ± 1,07[c]	58,0 ± 1,11[a]
IMA (%)	93,3 ± 0,65[ab]	91,2 ± 0,72[b]	94,7 ± 0,71[a]

IPIA, espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto; IPDA, espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado; DPIA, espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto; DPDA, espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado; IMP, total de espermatozoides con membrana plasmática intacta; y IMA, total de espermatozoides con la membrana acrosomal intacta. Diferentes superíndices en cada fila de cada categoría muestran diferencias significativas entre tratamientos en muestras frescas y congeladas – descongelas ([a-b-c] $P < 0,05$; [a-c] $P < 0,01$)

De la misma manera, los porcentajes de IMP e IMA disminuyeron significativamente ($P < 0,01$) después del proceso de criopreservación en comparación con sus contrapartes frescos. El porcentaje de IMP post-descongelación (equivalente a la viabilidad) fue superior ($P < 0,01$) en aquellas muestras congeladas con el tratamiento T3 comparado con aquellas muestras congeladas con los tratamientos T1 y T2. Los peores resultados de IMP fueron obtenidos cuando las muestras fueron congeladas con el 5% glicerol (T2). Con respecto a la IMA, a pesar de que la criopreservación afectó mínimamente a todos los tratamientos, las muestras congeladas – descongeladas del tratamiento T3 fueron superiores ($P < 0,01$) que aquellas que las de tratamiento T1 (Tabla 3).

4.3. Capacidad fecundante

La capacidad fecundante de los espermatozoides equinos congelados con los tres tratamientos se muestra en la Tabla 8. La unión o interacción de espermatozoides –

ovocitos post-FIV fue superior (P < 0,05) en aquellas muestras congeladas con el tratamiento T3 comparados con las muestras congeladas con T1 y T2. No obstante, todos esos valores de interacción entre gametos fueron significativamente inferiores (P < 0,01) en comparación con su contraparte control homóloga (Ho). Finalmente, aunque los porcentajes de ovocitos penetrados, polispermia y formación pronuclear fueron bajos en esta FIV heteróloga, no hubo diferencias significativas (P > 0,05) entre tratamientos (Tabla 4).

Tabla 8. Capacidad fecundante expresada en la interacción espermatozoide – ovocito y tasas de penetración, polispermia y formación de pronúcleos usando esperma de caballo congelado con DMF (T1), GLY (T2) y su combinación DMF-GLY (T3) y ovocitos bovinos. Los valores se expresan como (media ± SEM) de 15 repeticiones (número total de ovocitos o presuntos cigotos examinados = 912)

Tratamiento	**Unión espermatozoide y ovocito (n)**	**Penetración (%)**	**Polispermia (%)**	**Formación pronuclear (%)**
T1: DMF (n=258)	(1,3±0,14)^{c}	59 (22,9±2,62)^{b}	0 (0,0±0,00)^{b}	59 (22,9±2,62)^{b}
T2: GLY (n=214)	(0,8±0,11)^{c}	48 (22,4±2,86)^{b}	0 (0,0±0,00)^{b}	48 (22,4±2,86)^{b}
T3: DMF-GLY (n=240)	(4,3±0,45)^{b}	49 (20,4±2,61)^{b}	0 (0,4±0,42)^{b}	49 (20,0±2,59)^{b}
Control: Ho (n=200)	(6,5±0,59)^{a}	46 (22,9±3,49)^{a}	15 (7,5±1,87)^{a}	140 (70,0±3,49)^{a}

Ho: Fecundación in vitro homóloga; $^{a-c}$ Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos. $^{a-b-c}$ P < 0,05; $^{a-c}$ P < 0.001

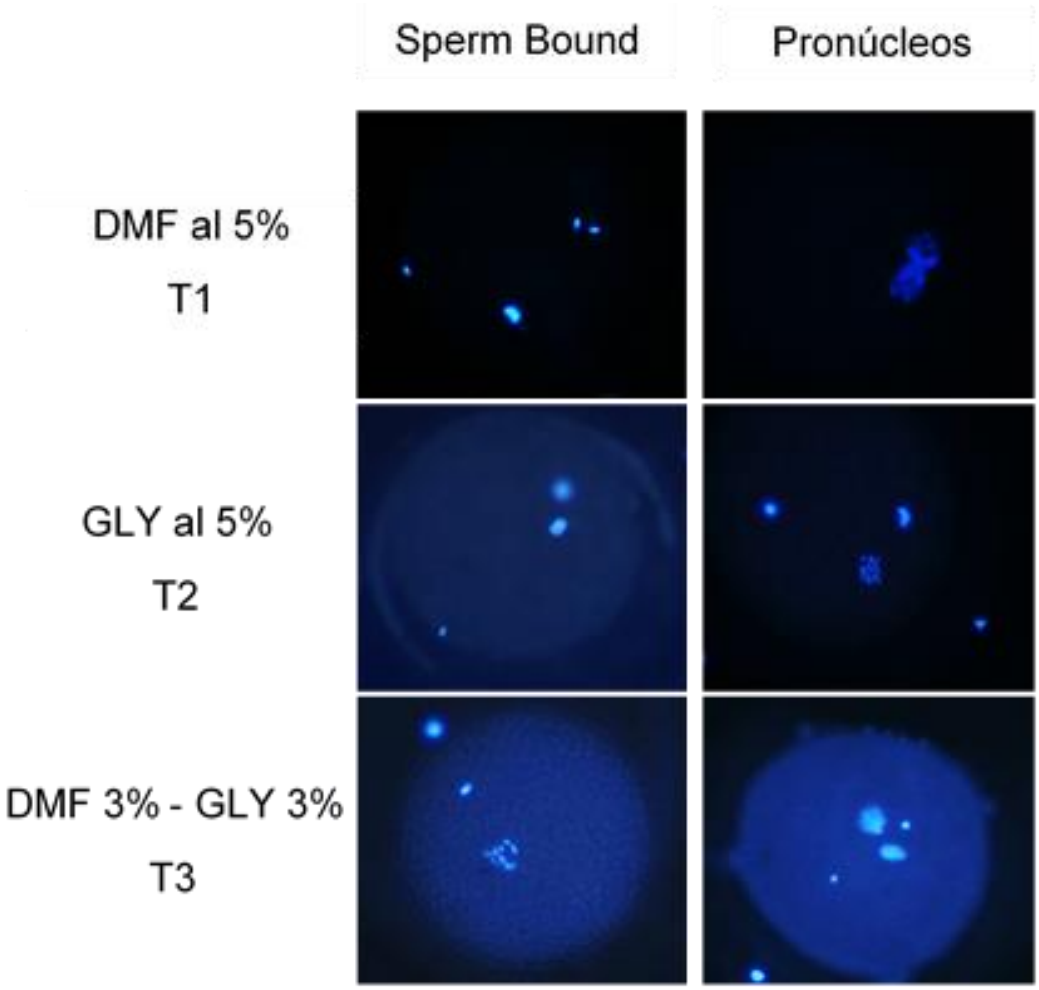


Figura 2. Evaluación de la unión espermatozoide-ovocito, y formación pronuclear después de FIV heteróloga.

4.4. Correlación entre variables cinemáticas y formación de pronúcleos

La correlación de las variables cinéticas de progresividad y fertilidad expresada en la capacidad que tuvieron los espermatozoides equinos criopreservados con DMF, GLY o DMF-GLY para penetrar, fecundar y formar pronúcleos están detallados en la Tabla 9. El tratamiento T3 que usó una combinación de DMF-GLY mostró una correlación

significativa (P < 0,05) entre las variables cinéticas como MP, VCL y VSL y la formación de pronúcleos. No obstante, los otros tratamientos T1 y T2 no mostraron ninguna correlación significativa (P > 0,10) entre parámetros cinemáticos y formación pronuclear.

Tabla 9. Correlación entre variables cinemáticas y el porcentaje de formación pronuclear de los cuatro tratamientos en estudio.

Variables de progresividad	**Tratamientos**					
	T1 DMF		**T2 GLY**		**T3 DMF-GLY**	
	r	P-value	r	P-value	r	P-value
MT (%)	0,0745	0,485	0,0406	0,719	0,1343	0,223
MP /%)	0,0004	0,997	0,0108	0,924	0,2168	0,048
VCL (µm/s)	0,0713	0,504	0,0023	0,984	0,2459	0,024
VSL (µm/s)	0,0296	0,782	0,0248	0,826	0,2401	0,028
STR (%)	0,0325	0,761	0,0117	0,917	0,0348	0,753
LIN (%)	0,1085	0,309	0,0283	0,802	0,0250	0,822

Valor ‘r’, grado de correlación entre variable cinemática progresiva y formación de pronúcleos por tratamiento; valor ‘P’, grado de significación (P < 0,10) según la prueba de correlación de Pearson entre variable cinemática progresiva y formación de pronúcleos por tratamiento.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que el uso de la DMF sola o combinada con GLY (ambos al 3%) produjeron una mejor cinética post-descongelación que el uso del GLY, basada en motilidades, velocidades y parámetros de relación de progresividad. De hecho, la combinación de DMF-GLY protegió mejor a los espermatozoides equinos durante la congelación debido a una mayor viabilidad (o integridad de membrana plasmática y acrosomal) posterior a la descongelación. Sin embargo, al realizar un ensayo de FIV heteróloga usando espermatozoides equinos congelados y ovocitos bovinos se determinó que los espermatozoides equinos congelados con DMF, GLY y DMGF-GLY tuvieron la misma capacidad fecundante para penetrar, fertilizar y formar pronúcleos.

Los ACP penetrantes como el GLY y DMF reemplazan el agua dentro de la evitando la formación de hielo intracelular durante el superenfriamiento (*supercooling*). Esto provoca que los ACP aumentan el volumen de los canales descongelados (*veins*) entre los cristales de hielo extracelulares, aumentando así el espacio disponible para las células posterior a la nucleación de hielo (Holt & Penfold, 2014). Además, los ACP disminuyen la concentración de sal en la solución descongelada (Meryman, 2007). Por otro lado, la toxicidad química del crioprotector también provoca daños en los espermatozoides (Gao et al., 1995). Por lo tanto, la concentración y el tipo de ACP influyen en el éxito de la criopreservación (Fernández-Santos et al., 2006). En nuestro trabajo estudiamos la concentración de DMF al 5% y su combinación con el GLY (DMF-GLY al 3 y 3%, respectivamente) y lo comparamos con el ACP convencional con 5% de GLY. Los resultados demostraron que la combinación fue más adecuada para proteger a los espermatozoides y obtener una mayor motilidad y cinemática en los espermatozoides equinos después de la descongelación.

Se han realizado algunos intentos para determinar los efectos benéficos y crioprotectores de las amidas en reemplazo del glicerol. El uso de MF y DMF protege a los espermatozoides equinos del daño criogénico con tanta eficacia como GLY (Squires

et al., 2004). Graham (1996) en un primer intento de criopreservar con amidas congeló 10 eyaculados de 10 caballos, utilizando una concentración fija de 0,55 M de glicerol (GLY), acetamida, metilacetamida (MA), formamida (FM), metilformamida (MF) o dimetilformamida (DMF). Se observó una mejor motilidad post-descongelación del glicerol frente a todas las amidas (60% vs. 8%, 20%, 5%, 40% y 37%, respectivamente). En este estudio se demostró que la acetamida fue tóxica y tuvo un efecto crioprotector deficiente. Más tarde, Graham, (1996) y Squires et al. (2004) compararon la respuesta crioprotectora de DMF y MF y obtuvo una motilidad post-descongelación similar o superior a la de GLY (40 – 50%). El efecto crioprotector de la DMF se atribuyó a la mejor capacidad de la molécula más pequeña para penetrar al espermatozoide y proteger la membrana plasmática y acrosomal, lo que induce menos estrés osmótico que GLY (Ghallab et al., 2017). Los resultados del presente estudio son consistentes a los resultados de los trabajos antes mencionados.

Por otro lado, un reporte inicial demostró que la combinación de GLY (al 1%, 3% y 5%) y DMF (al 1% y 3%) no proporcionó ninguna mejora con respecto al uso de GLY en la calidad espermática post-descongelación (Vidament et al., 2002). Contradictoriamente, Medeiros et al. (2002) demostraron que los espermatozoides congelados solo con DMF tuvieron una mayor motilidad y fertilidad que cuando se congelaban con DMF combinado con otros crioprotectores (ej. GLY). Estos reportes han demostrado resultados contradictorios sugiriendo que cada caballo reproductor se podría ajustar a la dosis más idónea de ACP para su criopreservación. Los resultados de este estudio, están en concordancia con los mencionados anteriormente, sugieren que la combinación a dosis bajas de GLY y DMF producen los mejores resultados de cinemática e integridad de membranas espermáticas.

Para probar la capacidad fertilizante del esperma equino congelado – descongelado se utilizó la FIV heteróloga. Como se mencionó anteriormente, la accesibilidad a ovocitos homólogos adecuados (de yeguas) puede ser limitada, como fue en este caso. Por lo tanto, el uso de FIV heteróloga con ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta fue

utilizada como herramienta para superar esta limitación. La FIV se ha descrito como un método eficaz para predecir la capacidad fecundante de esperma equino (McPartlin et al., 2009). Esta investigación expuso información específica sobre la unión, penetración, poliespermia y formación de pronúcleos de espermatozoides equinos criopreservados con DMF, GLY y DMF-GLY después de 24 h post-FIV.

Los resultados mostraron que el tratamiento T3 tuvo una interacción entre espermatozoides equino congelados-descongelados y ovocitos bovinos madurados in vitro más alta en comparación con los otros dos tratamientos (T1 y T2). No obstante, nosotros demostramos que los espermatozoides equinos congelados con DMF, GLY o DMF-GLY tuvieron la misma capacidad de penetrar los ovocitos bovinos, fertilizarlos y formar pronúcleos a las 24 h. Asimismo, se pudo evidenciar una correlación significativa entre las variables cinemáticas (ej. motilidad progresiva y velocidades curvilínea y rectilínea) y formación de pronúcleos solo en los espermatozoides congelados con DMF-GLY. Esto indica que los espermatozoides equinos fueron capaces de sufrir una reacción acrosómica y los ovocitos bovinos fueron capaces de reconocer espermatozoides equinos, lo que está de acuerdo con un estudio anterior que sugiere que el sistema lítico del acrosoma se conserva entre los mamíferos (Sessions-Bresnahan et al., 2014).

Los hallazgos del presente estudio son consistentes con los de estudios previos en los que se evaluó la capacidad de fertilización de los espermatozoides equinos congelados utilizando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta (Sessions-Bresnahan et al., 2014; De Vasconcelos Franco et al., 2016). Estos estudios mencionados anteriormente encontraron una formación pronuclear entre 14 % y 26 % después de 22 a 26 h post-FIV, incluso la tasa de clivaje alcanzó un 30 % a las 56 hpi (Sessions-Bresnahan et al., 2014). Este tiempo más largo de lo esperado para la formación de pronúcleos se atribuye a las diferencias en las tasas de unión espermatozoides de caballos y ovocitos de vaca y su posterior penetración (Sessions-Bresnahan et al., 2014; Consuegra et al., 2020). Por lo tanto, al igual que los trabajos antes mencionados, nosotros creemos que las bajas tasas de formación pronuclear en la FIV heteróloga

equina es más que una incapacidad de los espermatozoides para penetrar la zona pelúcida, sino que existe otros factores relacionados con la formación pronuclear o la tasa de clivaje.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

Esta investigación concluye que el uso de la DMF sola o combinada con GLY produjo una mejor crioprotección a los espermatozoides equinos durante la congelación y descongelación basada en cinemática e integridad de membranas plasmática y acrosomal que cuando se usó GLY. No obstante, la capacidad fecundante in vitro determinó que tanto la DMF, GLY y su combinación produjeron iguales tasas penetración, fecundación y formación de pronúcleos.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

- Promover capacitaciones a establos o criaderos e caballos sobre la biotecnología reproductiva equina.
- Se requiere más estudios con énfasis en la fecundación *in vitro* heteróloga con esperma equino.
- A futuros estudiantes que tengan afinidad en estos temas biotecnológicos para lograr la complementación de la información.
- Mantener y/o mejorar los convenios con entidades públicas que nos facilitan el material biológico para las investigaciones.

CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFÍA

Al-Essawe, E. M., Wallgren, M., Wulf, M., Aurich, C., Macías-García, B., Sjunnesson, Y., & Morrell, J. M. (2018). Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology*, *115*, 99–107.

Alvarenga, M A, Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). *Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen : A review*. *89*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001

Alvarenga, Marco Antonio, Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, *32*(3), 521–530. https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003

Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & & Luño, V. (2014). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, *69(1)*, 144–148. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008

Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014a). Cryobiology Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 Ò extender q. *Cryobiology*, *69*(1), 144–148. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008

Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014b). Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, *69*(1), 144–148. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008

Amann, R. P. (1981). SPERMATOGENESIS IN THE STALLION : A REVIEW. *Journal of Equine Veterinary Science*, *1*(4), 131–139. https://doi.org/10.1016/S0737-0806(81)80046-9

Amann, R. P. & P. B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, *7(3)*, 145–173.

Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). *PRINCIPLES OF CRYOPRESERVATION AND A REVIEW OF CRYOPRESERVATION OF STALLION SPERMATOZOA*. *7*(3), 145–173.

Ávila-portillo, L. M., Madero, J. I., & López, C. (2006). *Basic points in cryopreservation*. *57*(4), 291–300.

Balao da Silva, C. M., Spinaci, M., Bucci, D., Giaretta, E., Peña, F. J., Mari, G., & Galeati, G. (2013). Effect of sex sorting on stallion spermatozoa: Heterologous oocyte binding, tyrosine phosphorylation and acrosome reaction assay. *Anim. Reprod. Sci*, *141*, 68–74.

Banaszewska, D., Czubaszek, M., Jędrzejowska, R. W.-, & Andraszek, K. (2015). *Morphometric dimensions of the stallion sperm head depending on the staining method used*. 263–270. https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0039

Brahmkshtri, B., Edwin, M., John, M., Nainar, A., & Krishnan, A. (1999). Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. *Anim Reprod Sci*, *159e68*. https://doi.org/. https://doi.org/ 10.1016/S0378-4320(98)00108-0

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

Busato, E., Gomes, T., Machinski, A., Formighieri, M., & Weiss, R. (2017). *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*.

Chávez, A. (2013). *EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS*

EQUINOS UTILIZANDO SUERO DE YEGUA EN DOS ETAPAS DEL ESTRO, Y UNIONES HETERÓLOGAS CON ESPERMATOZOIDES EQUINOS TRATADOS CON HEPARINA Y PROCAÍNA.

Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Reproduction*, *42(2)*, 277–285.

Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Sánchez-Calabuig, M. J., & Hidalgo, M. (2020). Fertilizing capacity of vitrified stallion sperm assessed utilizing heterologous IVF after different semen warming procedures. *Animal Reproduction Science*, *223*.

Contreras, M. J., Treulen, F., Arias, M. E., Silva, M., Fuentes, F., Cabrera, P., & Felmer, R. (2020). Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(2), 229–239. https://doi.org/10.1111/rda.13611

Contreras, W., & Santiani, A. (2020). *Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (Vicugna pacos)*. *31*(1), 1–9.

Cook, N. L., Masterson, K. R., Battaglia, D., Beck, R., & Metcalf, E. S. (2019). Dimethyl sulfoxide and glycerol as cryoprotectant agents of stallion semen: Effects on blastocyst rates following intracytoplasmic sperm injection of IVM equine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(3), 253–258. https://doi.org/10.1071/RD19266

Curry, M. R. (2007). Cryopreservation of mammalian semen. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 303–311.

De Vasconcelos Franco, J. S., Faheem, M., Chaveiro, A., & M., & da S. F. (2016). Effects

of α-tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous in vitro fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*, *86(4)*, 957–962.

Dell'Aquila, M. E., Fusco, S., & Lacalandra, G. M. & Maritato, F. (1996). In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, *45(3)*, 547–560.

Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Montoro, V., Soler, A. J., & Garde, J. J. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian Red Deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa: Effects of concentration and temperature of addition. *Journal of Andrology*, 734–745. https://doi.org/https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000505

Galarza, D. A., M., L. de G., Beltrán-Breña, P., Sánchez-Calabuig, M. J., Rizos, D., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk- and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*, *133*, 29–37.

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.

Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., Mcgann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, *1109–1122*. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103

Ghallab, A. R. M., Shahat, A. M., Fadl, A. M., Ayoub, M. M., & Moawad, A. R. (2017). Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*, *79*, 14–20. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.001

Gibb, Z, Morris, L. H. A., Maxwell, W. M. C., & Grupen, C. G. (2013). Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, *79*(7), 1027–1033. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.013

Gibb, Zamira, & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, *43*, S29–S36. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006

Govaere, J. L. J., Hoogewijs, M. K., De Schauwer, C., De Vliegher, S., Van Soom, A., Duchateau, L., & de Kruif, A. (2014). Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, *49(3)*, 487–491.

Graham, J. K. (1996). Cryopregservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, *12(1)*, 131-147.

Hasler, J. F., & Barfield, J. P. (2015). In Vitro Fertilization. *Bovine Reproduction*. https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch81

Holt, W. ., & Penfold, L.M. (2014). Animal andrology : theories and applications. *Anim. Androl. Theor. Appl*, 78–81.

Leemans, B., Gadella, B. M., Tom, S., Schauwer, C. De, Nelis, H., Hoogewijs, M., & Soom, A. Van. (2016). *Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization*. https://doi.org/10.1530/REP-16-0420

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. *Anim Reprod Sci*, 119.

Maxwell W., Evans G., RhodesS., Hillard M., B. B. (1993). Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fertil.*, *Dev. 5*, 57. https://doi.org/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.

McPartlin, L. A., Suarez, S. S., Czaya, C. A., & Hinrichs, K., & Bedford-Guaus, S. J. (2009). Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biology of Reproduction*, *81(1)*, 199–206.

Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). *Cryopreservation of stallion sperm using different amides*. *58*, 273–276.

Meryman, H. T. (2007). Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*, 935–945.

Mesa, A. M., Sc, M., R, G. H., & & Sc, M. (2012). *Effect of cholesterol and dimethiyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm*. *17(1)*, 2908–2915.

Morillo Rodriguez, A., Balao da Silva, C., Macías-García, B., Gallardo Bolaños, J. M., Tapia, J. A., Aparicio, I. M., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2012). Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics of Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 47, Issue 6, pp. 995–1002). https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02005.x

Peña, F., Macías García, B., Samper, J., Aparicio, I., Tapia, J., & Ortega Ferrusola, C. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, *76*, 1177–1186. https://doi.org/10.1016/j.therioge-nology.- 2011.06.023

Pesch, S., & Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, *37*(7), 597–612. https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006

Pradieé, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., O'Brien, E., Esteso, M. C., Beltrán-Breña, P., Maillo, V., Santiago-Moreno, J., & Rizos, D. (2018). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (Capra pyrenaica). *Theriogenology*, *108*, 314–320.

R. Yanagimachi. (1994). *Mammalian fertilization. In The Physiology of Reproduction*. *1*, 154–162.

Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., & Gadella, B. M. (2001). *Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa*. *470*, 462–470.

Rica, C. (2012). Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino. *Revista Ciencias Veterinarias*, *26*(1), 7–20.

Sadurní, C. (2020). *Nuevos Avances en Tecnologías Reproductivas en Equinos*. 1–64.

Sánchez-Calabuig, M. J., Fuente, J. de la, Laguna-Barraza, R., Beltrán-Breña, P., Martínez-Nevado, E., Johnston, S. D., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., & Pérez-Gutiérrez, J. F. (2015). Heterologous murine and bovine IVF using bottlenose dolphin (Tursiops truncatus). *Theriogenology*, *84*, 983–994.

Santiani, A., Evangelista-Vargas, S., Vargas, S., Gallo, S., Ruiz, L., Orozco, V., & Rosemberg, M. (2017). Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia*, *49*(6). https://doi.org/10.1111/and.12672

Sessions-Bresnahan, D. R., Graham, J. K., & Carnevale, E. M. (2014). Validation of a

heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. *Theriogenology*, *82(2)*, 274–282.

Sevilla, E. superior de ingenieros de. (n.d.). GENERALIDADES DE LA CRIOPRESERVACIÓN. In *Modelado matemático e implementación práctica de sistema de vitrificación ultra- rápida mediante radiación láser* (pp. 7–29).

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

Tremoleda, J., Gadella, B., Stout, T., & Colenbrander B & Bevers MM. (2003). *Evaluation of sperm-oocyte interaction during in vitro fertilization in the horse. In Vitro Production of Horse Embryos: Fundamental Aspects.* 67–91.

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

Vidament, M., Daire, C., Yvon, J. M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., & Ecot, P. (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, *58*(2–4), 249–251. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00854-3

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

Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dong, H., Zhang, G., Yu, W., Tian, F., He, L., & Chen, J. (2015). Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, *163*, 75–81.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.020

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

ZURITA, R. (2019). *EVALUACIÓN DE GLICEROL, ETILENGLICOL, DIMETILSULFÓXIDO, DIMETILFORMAMIDA Y DIMETILACETAMIDA COMO AGENTES CRIOPROTECTORES DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA.*

CAPÍTULO 9: ANEXOS

Anexo 1. *Ovarios lavados y atemperados en solución salina.*

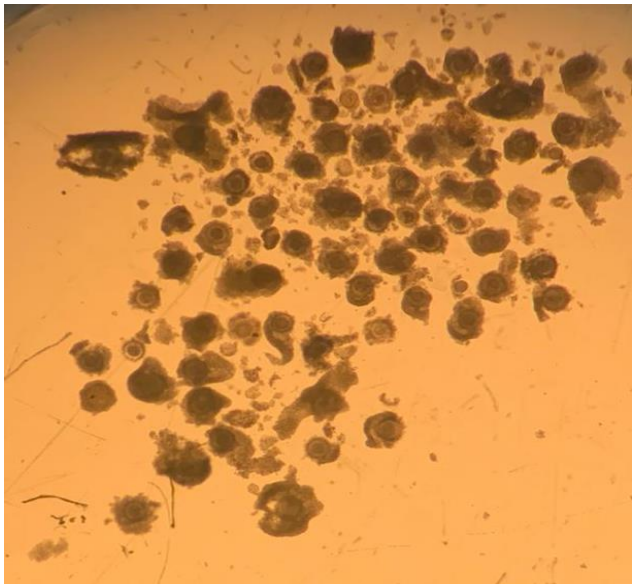
Fuente: Los autores

Anexo 2. *Aspiración folicular*

Fuente: Los autores

***Anexo 3**. Búsqueda de COC's en estereoscopio*

Fuente: Los autores



***Anexo 4**. Selección de COC's de tipo A y B*

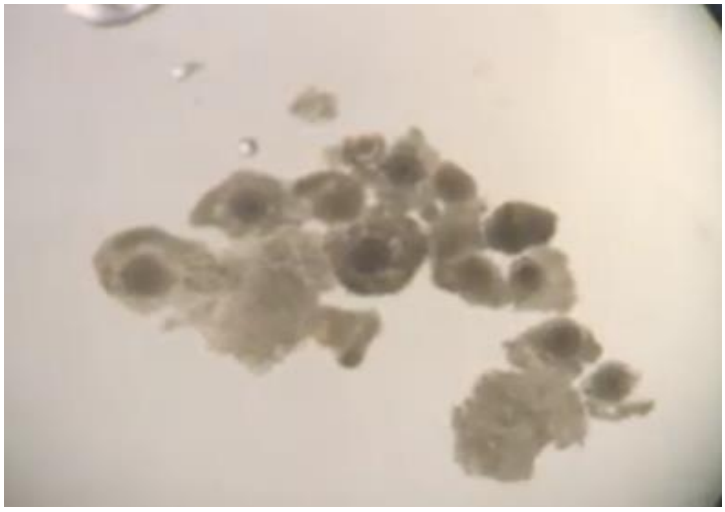
Fuente: Los autores

Anexo 5. *Cámara de CO2 para la maduración de ovocitos bovinos*

Fuente: Los autores

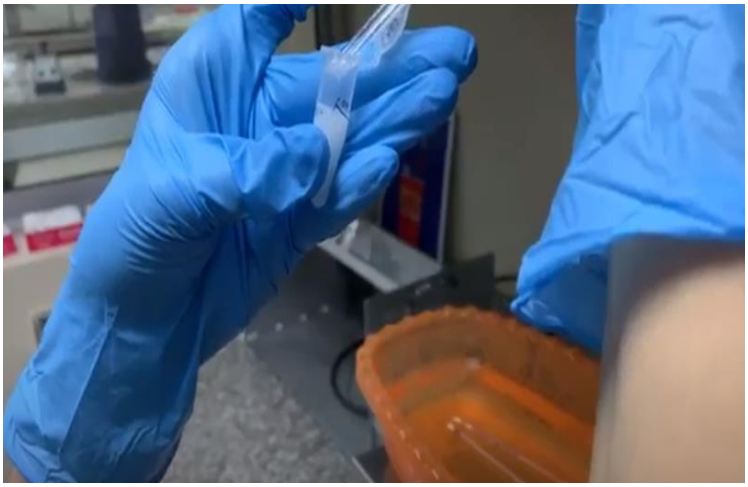
Anexo 6. *Ovocitos en medio de maduración*

Fuente: Los autores



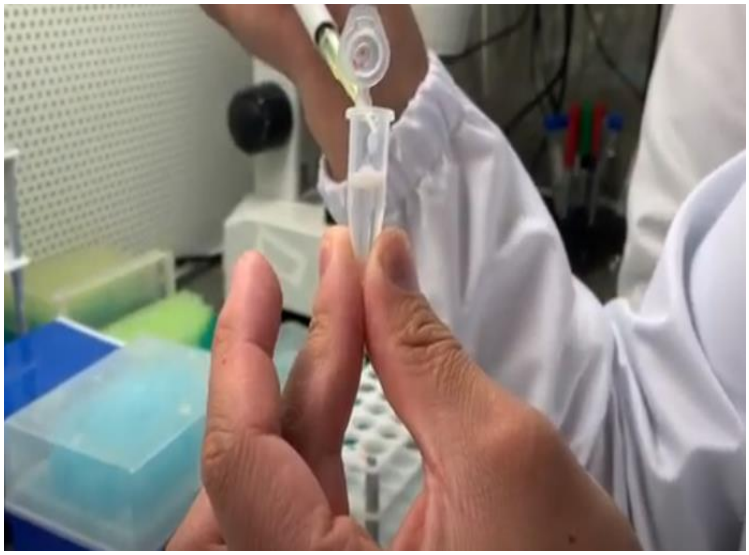
Anexo 7. *Ovocitos maduros después de 24 horas*

Fuente: Los autores



Anexo 8. *Poll de semen equino descongelado*

Fuente: Los autores

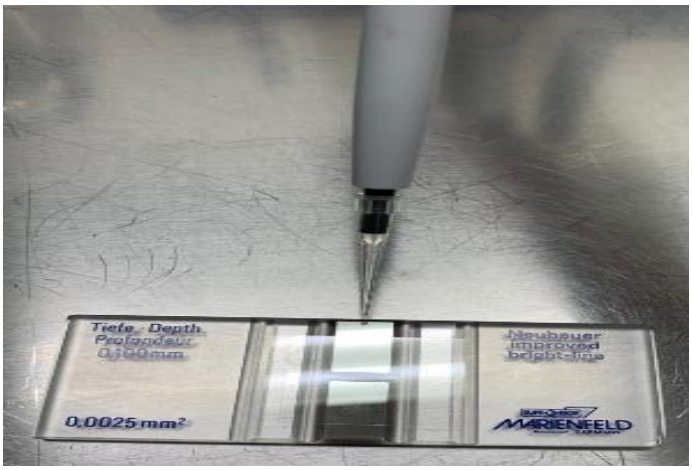


Anexo 9. *Columnas de concentración de Percoll más semen equino*

Fuente: Los autores

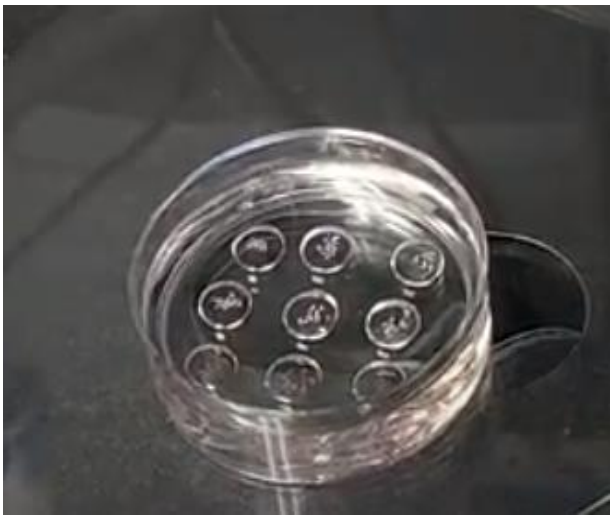
Anexo 10. *Proceso de capacitación espermática*

Fuente: Los autores



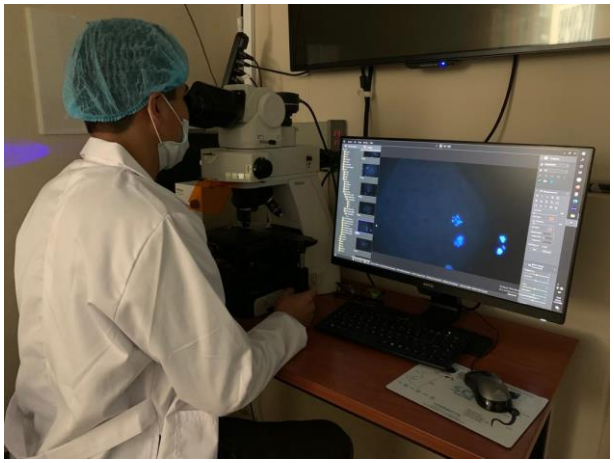
Anexo 11. Cálculo de concetración espermática en la *cámara de Neubauer*

Fuente: Los autores



Anexo 12. *Ovocitos fecundados con semen equino*

Fuente: Los autores



Anexo 13. Observación de presuntos cigotos en microscopio de fluorescencia.

Fuente: Los autores