

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post- descongelación

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

Autores:

Erika Margoth Serpa Carangui

CI: 0302490529

Correo electrónico: eri.serpa25@gmail.com

Francisco Javier De la Cruz Tandazo

CI: 2100253943

Correo electrónico: javier12342@hotmail.com

Director:

Dr. Manuel Elías Soria Parra MgS.

CI: 1801620186

**Cuenca – Ecuador
29 de septiembre – 2022**

RESUMEN

La formación de hielo intracelular y extracelular va a depender de la velocidad de enfriamiento y, en consecuencia, la criosupervivencia espermática. Esta investigación evaluó la eficacia de un protocolo de criopreservación de dos rampas de congelación con velocidades de enfriamiento aceleradas frente a dos protocolos de congelación comercial: uno convencional con velocidades de enfriamiento desaceleradas, y otro con velocidades programadas con congelador biológico. Para esto, 24 eyaculados de 4 caballos Árabes sexualmente maduros fueron recolectados con una vagina artificial, diluidos con Botusemen Gold® + 5% dimetilformamida, y congelados exponiendo las pajuelas (0,5 mL) a nitrógeno líquido (NL₂) en tres protocolos distintos: [1] PCC-1: Convencional (Minitube®) con 1 rampa de congelación a 5 cm del nivel de NL₂ durante 10 minutos; [2] PC2R-2: dos rampas a 17 cm (durante 4 minutos) y 2 cm (durante 2 minutos) del nivel de NL₂ mantenidas dentro de un cryo-box de 31 x 31 x 30 cm (largo, ancho y alto, respectivamente); y [3] PCBP-3: congelador biológico programable TK-4000 (Tecnología®). La nucleación de hielo y la velocidad de enfriamiento inicial se produjeron a los -13,8°C a 63,5°C/min, a -8,5°C a 19°C/min, y a -5,9°C a -11,4°C/min, respectivamente en el PCC-1, PC2R-2 y PCBP-3. El proceso de criopreservación redujo ($P < 0,01$) los parámetros cinemáticos e integridad de las membranas espermáticas, independientemente del protocolo usado. No se registró diferencias significativas ($P > 0,05$) ni en la cinemática ni en integridad de la membrana plasmática entre protocolos de congelación. Sin embargo, los protocolos PC2R-2 y PCBP-3 produjeron una mayor integridad acrosomal post-descongelación comparado con el protocolo PCC-1. En conclusión, el protocolo PC2R-2 produjo velocidades de enfriamiento aceleradas y una criosupervivencia de espermatozoides equinos similar a los protocolos comerciales de congelación convencional o de velocidades programadas, incluso mejorando la integridad acrosomal. Se recomienda el uso del protocolo de congelación de dos rampas como alternativa exitosa para criopreservar espermatozoides equinos debido a su fácil aplicación, eficacia y menos consumo de NL₂.

Palabras claves: Espermatozoides. Criosupervivencia. Protocolos de congelación. Cinemática.

ABSTRACT

The cooling rate determines intracellular and extracellular ice formation and, consequently, sperm cryosurvival. This work evaluated the efficacy of a cryopreservation protocol based on two freezing ramps with accelerating cooling rates compared with two commercial freezing protocols: one conventional with decelerating cooling rates, and another with programmed cooling rates by the biological freezer. For this, 24 ejaculates from 4 sexually adult Arabian stallions were collected with an artificial vagina, diluted with Botusemen Gold® + 5% dimethylformamide, and frozen by exposing the straws (0.5 mL) to liquid nitrogen (LN₂) in three different protocols: [1] PCC-1: Conventional (Minitube®) with 1 freezing ramp at 5 cm from the LN₂ level for 10 min; [2] PC2R-2: two ramps at 17 cm (for 4 min) and 2 cm (for 2 min) from the level of LN₂ content inside a cryo-box of 31 x 31 x 30 cm (length, width, and height, respectively); and [3] PCBP-3: programmable biological freezer TK-4000 (Tecnologia®). Ice nucleation and initial cooling rate occurred at -13.8°C to 63.5°C/min, at -8.5°C to 19°C/min, and at -5.9°C to -11.4°C/min for PCC-1, PC2R-2, and PCBP-3, respectively. The cryopreservation process reduced ($P < 0.01$) the kinematic parameters and integrity of sperm membranes, regardless of the protocol used. There were no significant differences ($P > 0.05$) neither kinematics nor plasma membrane integrity between freezing protocols. However, the PC2R-2 and PCBP-3 protocols produced higher post-thaw acrosomal integrity than the PCC-1 protocol. In conclusion, the PC2R-2 protocol produced accelerating cooling rates and cryosurvival of equine spermatozoa similar to commercial protocols of conventional freezing or programmed cooling rates, even improving acrosomal integrity. The use of the two-ramp freezing protocol is recommended as a successful alternative to cryopreserve stallion sperm due to its easy application, efficacy, and less consumption of LN₂.

Keywords: Spermatozoa. Cryosurvival. Freezing protocols. Kinematics.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
AGRADECIMIENTO.....	12
DEDICATORIA	13
DEDICATORIA	14
1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo General.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. HIPÓTESIS.....	22
4. REVISION DE LA LITERATURA	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Materiales	35
5.1.1 Materiales físicos.....	35
5.1.2 Materiales Biológicos	35
5.1.3 Reactivos	35
5.1.4 Materiales de Laboratorio.....	36
5.2 Metodología	37
5.2.1 Área de estudio.....	37
5.2.2 Diseño Experimental	37
5.2.3 Metodología para la investigación.....	39
6. RESULTADOS	45
6.1. Velocidades de enfriamiento y nucleación de hielo por protocolo	45
6.1.1. Protocolo 1 – PCC-1	45
6.1.2. Protocolo 2 – PC2R-2	46
6.1.3. Protocolo 3 – PCBP-3.....	47
6.2. Efecto de los protocolos congelación sobre calidad espermática.....	48
6.2.1. Cinemática espermática.....	48
6.2.2. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal.....	51
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES.....	57
8. RECOMENDACIONES.....	58

Bibliografía	59
ANEXOS	67
Anexo 1. Valores promedios \pm SEM de los parámetros cinéticos del sistema CASA de las muestras frescas y criopreservadas por cada protocolo de congelación.....	67
Anexo 2. Valores promedios \pm SEM de la Integridad simultánea y total de las membranas plasmáticas y acrosomal.....	67
Anexo 3. Valores promedios \pm SEM de los parámetros cinéticos en muestras frescas y criopreservadas con los tres protocolos y por reproductor.....	68
Anexo 4. Valores promedios \pm SEM de las subcategorías de integridad simultánea y total de membranas plasmática y acrosomal en muestras frescas y criopreservadas con los tres protocolos y por reproductor.....	69
Anexo 5. Recolección de semen con vagina artificial (VA)	70
Anexo 6. Dilución, almacenamiento y transporte de muestra seminal	70
Anexo 7. Procesamiento en laboratorio	71
Anexo 8. Evaluación en sistema CASA y fluorescencia	72
Anexo 9. Métodos de Crio preservación.....	72
.....	72
Anexo 10. Detección de calor latente y punto de fusión.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología del espermatozoide y metabolismo energético que realiza esta célula a partir de glucosa en la pieza principal y en la pieza media.	24
Figura 2: Membrana plasmática.....	26
Figura 3: Cabeza del espermatozoide.....	26
Figura 4: Cuello y Flagelo.....	27
Figura 5: Diseño experimental de tres protocolos de congelación	39
Figura 6: Curva de congelamiento del protocolo de congelación PC1R-. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño.....	45
Figura 7: Curva de congelamiento del protocolo de congelación PC2R-2. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño	46
Figura 8: Curva de congelamiento del protocolo de congelación PCBP-3. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño	47
Figura 9: Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* P < 0,001). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, P<0,001).	49
Figura 10: Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* P < 0,001). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, P<0,001).....	49
Figura 11: Parámetros de progresión como la rectitud (STR), linealidad (%) y oscilación (WOB) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias	

significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$). 50

Figura 12: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de flagelo (BCF) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$). 50

Figura 13: Porcentajes de espermatozoides en las distintas categorías de integridad de la membrana (evaluadas con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,01$; a-c, $P < 0,001$). 52

Figura 14: Integridad de la membrana plasmática (IMP, %) y acrosomal (IMA, %) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,01$; a-c, $P < 0,001$). 53

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Erika Margoth Serpa Carangui en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post-descongelación", 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, 29 de septiembre de 2022



Erika Margoth Serpa Carangui

0302490529

Cláusula de Propiedad Intelectual

Erika Margoth Serpa Carangui, autora del trabajo de titulación "Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post-descongelación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 29 de septiembre de 2022



Erika Margoth Serpa Carangui

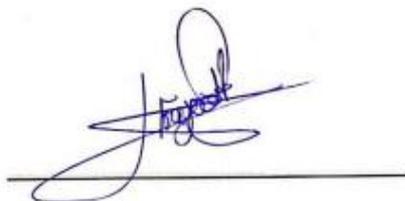
0302490529

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Francisco Javier De la Cruz Tandazo en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post-descongelación", 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, 29 de septiembre del 2022



Francisco Javier De la Cruz Tandazo

C.I: 2100253943

Cláusula de Propiedad Intelectual

Francisco Javier De la Cruz Tandazo, autor/a del trabajo de titulación "Eficacia de tres protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos con diferentes velocidades de enfriamiento sobre la calidad espermática post-descongelación", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29 de septiembre del 2022



Francisco Javier De la Cruz Tandazo

C.I: 2100253943

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a nuestra familia por el apoyo brindado, por creer en nosotros y apoyarnos siempre a lo largo de nuestra carrera universitaria.

Al Dr. Manuel Soria, al Dr. Andrés Galarza y al Dr. Xavier Samaniego que nos han brindado el conocimiento y apoyo tanto en trabajo de campo como en laboratorio guiándonos constantemente en el desarrollo de esta tesis.

Al señor Felipe Andrade y al Dr. Manuel Soria quienes nos han permitido realizar nuestra investigación al abrirnos las puertas de sus criaderos y el uso de sus equinos.

A todos los que componen el tribunal de tesis gracias por la disponibilidad y consejos que nos han permitido mejorar y culminar este trabajo.

Erika y Javier.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Rocio y Mesias, a mis hermanos Martin y Maribel que siempre estuvieron a mi lado brindándome apoyo incondicional en todo el transcurso de mi carrera universitaria y me han alentado siempre a alcanzar mis metas.

Y a mi compañero de tesis Javier que juntos compartimos una larga amistad y sobre todo conocimientos para desarrollar y culminar este trabajo de tesis.

Erika.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de graduación a mis padres, Francisco y Luci quienes han sido pilares fundamentales en mi vida y quienes me han apoyado a lo largo de toda mi carrera universitaria, a mi hermana Dayana quien siempre estuvo presente en cada paso que di, a Dios por darme la fortaleza para seguir adelante frente a todas las adversidades.

A mi compañera de tesis Erika quien siempre estuvo conmigo a lo largo de toda la carrera, con quien he formado una relación de amistad sin igual y quien ha sido parte fundamental para alcanzar esta meta juntos.

Javier.

ACRÓNIMOS.

GLY	Glicerol
DMF	<i>Dimetilformamida</i>
ACP	<i>Agentes criopenetrantes</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
PUFA	<i>Ácidos grasos poliinsaturados</i>
LPO	<i>Peroxidación lipídica</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
SOD	<i>Superóxido dismutasa</i>
CAT	<i>Catalasa</i>
GR	<i>Glutación reductasa</i>
GPx	<i>Glutación peroxidasa</i>
VA	<i>Vagina artificial</i>
PI	<i>Yoduro de propidio</i>
PNA- FICT	<i>Aglutinina</i>
KOH	<i>Hidróxido de potasio</i>
MP	<i>Motilidad progresiva</i>
MT	<i>Motilidad total</i>
VCL	<i>Velocidad curvilínea</i>
VSL	<i>Velocidad rectilínea</i>
VAP	<i>Velocidad promedio</i>
LIN	<i>Linealidad</i>
STR	<i>Rectitud</i>
WOB	<i>Oscilación</i>

UCUENCA

BCF	<i>Frecuencia de batida de flagelo</i>
ALH	<i>Amplitud del. Desplazamiento lateral de la cabeza</i>
IPIA	<i>Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto</i>
IPDA	<i>Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado</i>
DPIA	<i>Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto</i>
DPDA	<i>Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado</i>
IMP	<i>Membrana plasmática intacta</i>
IMA	<i>Membrana acrosomal intacta</i>
IA	<i>Inseminación artificial</i>
CASA	<i>Computer Assisted Semen Analysis</i>

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides tiene un interés “conservativo” para especies y razas bajo amenaza latente de extinción, para su uso en programas de mejora genética en razas productivas. A pesar de los avances biotecnológicos en la criopreservación de semen equino, las tasas de fertilidad logradas en yeguas después de una inseminación artificial (IA) con semen criopreservado siguen siendo bajas (Santiago-Moreno & Galarza, 2019). En este sentido, las tasas de fertilidad en yeguas están relacionada directamente con la criosupervivencia espermática, ya sea después de los procesos de refrigeración, congelación o vitrificación.

Durante la criopreservación, los espermatozoides equinos son susceptibles a diversos mecanismos de estrés osmótico (Pérez et al., 2017) y, en consecuencia, provocan daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en varias células (Maxwell et al., 1993). Principalmente, ocurren tres eventos durante la congelación y descongelación: formación de cristales de hielo (intra y extracelular), choque de frío y estrés osmótico. Estos eventos están relacionados directamente con las velocidades de enfriamiento durante el rango crítico de temperatura (-5 a -50°C) (Mazur, 1974). Las velocidades de enfriamiento son determinadas por las rampas de congelación contenidos dentro de una caja criogénica (Grötter et al., 2019). Las rampas de congelación influyen en las tasas de criosupervivencia celular. Tanto las rampas de congelación que producen velocidades enfriamiento extremadamente rápidas o extremadamente lentas, tienen efectos deletéreos sobre los espermatozoides (Mesa & Henao, 2012). Las velocidades de enfriamiento muy rápidas podrían inducir a la formación de hielo intracelular (Holt & Penfold, 2014), mientras que velocidades de enfriamiento muy lentas pueden causar una deshidratación extrema del espermatozoide. Estos daños celulares están relacionados con alteraciones de las proteínas y lípidos de la membrana plasmática, interrupción de la membrana mitocondrial y la generación desmesurada de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos eventos desencadenan una peroxidación lipídica (LPO) de la membrana plasmática del espermatozoide equino provocando una degeneración y muerte celular (Neild et al., 2005).

Por otro lado, las velocidades de enfriamiento influyen en las características físicas de los cristales de hielo de todo el medio de congelación (diluyentes, azúcares, sales y ácidos). Durante la congelación el líquido extracelular del diluyente es marcadamente enfriado (*supercooling*), y antes de su congelación se desplaza en estado líquido (agua) conformando los llamados “*lakes*”; y soluciones hipertónicas que contiene diluyente y células llamados “*veins*” (Mazur, 1974). Las rampas de congelación determinan la supervivencia de los espermatozoides debido a que durante la congelación, los espermatozoides son ubicados en las *veins*, y durante la descongelación, algunas de ellas son liberadas y rehidratadas conservando su integridad estructural y funcional (Grötter et al., 2019; Katkov & Bolu, 2012).

El protocolo de congelación convencional incluye una rampa de flotación ubicada a 4 – 5 cm del nivel de nitrógeno líquido (NL₂), y produce velocidades de enfriamiento rápidas al inicio de la congelación y conforme avanza el tiempo las velocidades se van ralentizando. Estos protocolos convencionales son conocidos por provocar velocidades de enfriamiento por desaceleración. Estudios previos han demostrado que la congelación convencional no es la manera más eficiente de congelar espermatozoides debido a los daños provocados intracelularmente por los cristales de hielo letales durante la nucleación de hielo y la rápida disipación del calor latente de fusión. Por lo tanto, estos protocolos convencionales producen velocidades de enfriamiento por desaceleración, este inicia el proceso de criopreservación con velocidades mayores a 40°C/min antes y durante la nucleación de hielo, seguidas por velocidades más lentas 17 y 3°C/min hasta el punto de glasificación (-80°C) (Esteso et al., 2018; Galarza et al., 2019).

Este sistema convencional, genera vapores de NL₂ que muchas veces son inestables y las velocidades de enfriamiento aumentan, esto provoca una congelación más rápida en los espermatozoides contenidos dentro de las pajuelas. Como resultado de esta congelación convencional, las muestras espermáticas reducen la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides, y solo un porcentaje mantiene su integridad, funcionalidad y/o capacidad fecundante (Loomis & Graham, 2008). Estudios previos han demostrado resultados variables después de criopreservar espermatozoides equinos con

estos protocolos convencionales; unos han demostrado una motilidad y viabilidad de 61,8% y 56,2%, respectivamente (Elizabeth Varela et al., 2015); mientras que otras investigaciones han demostrado estos mismo parámetros entre el 48,0 % y 52,8% (Domingo , Acosta, Restrepo, Camacho, & Pérez, 2017).

En la actualidad, existen protocolos de congelación que producen velocidades de enfriamiento por aceleración. Estas velocidades se logran mediante el uso de biocongeladores programables. Estos equipos han demostrado resultados deseables sobre a criosupervivencia celular en espermatozoides equinos, pero no resultan ser aplicables, debido a la dificultad de manejo en campo y a su elevado costo de adquisición y mantenimiento.

En este sentido, otros protocolos alternativos a la congelación convencional, que permitan mejorar la supervivencia celular, mediante la producción de velocidades de enfriamiento por aceleración deben ser implementados. La criopreservación de espermatozoides equinos con cryo-box (cajas criogénicas de poliestireno) y rampas de congelación a diferentes alturas, resultan ser alternativas novedosas.

Existe evidencia científica que al usar velocidades de enfriamiento inicialmente lentas de 4 - 5°C/min desde +5°C hasta -10°C, y luego acelerar a velocidades más altas como 25 o 45°C/min, produce una mayor respuesta a la supervivencia celular (Esteso et al., 2018). Esta criosupervivencia ha sido evidenciada en una mayor motilidad y viabilidad de los espermatozoides comparado con los protocolos convencionales. De hecho, Woelders & Chaveiro (2004), diseñaron modelos matemáticos para predecir las velocidades de enfriamiento óptimas para la criopreservación de espermatozoides en mamíferos y sugieren usar velocidades de enfriamiento iniciales lentas hasta la nucleación de hielo (-8 a -14°C) y luego acelerar hasta llegar al estado de glasificación. Estas velocidades controladas han demostrado una mayor supervivencia celular después de la descongelación.

En este sentido, los actuales protocolos de criopreservación de espermatozoides de caballo han sido diseñados con velocidades de enfriamiento programables por medio de Biocongeladores (Moore et al., 2006; Salazar et al., 2011). En un estudio se determinó que al congelar semen con velocidades de

UCUENCA

enfriamiento lento por aceleración se obtienen mejores resultados sobre los criterios de criosupervivencia celular (motilidad y viabilidad) (Salazar et al., 2011) lo cual también es corroborado por Forero-González et al. (2012) al obtener mejores resultados de motilidad después de utilizar velocidades de enfriamiento por aceleración frente a protocolos convencionales.

Por todo lo mencionado anteriormente, la criopreservación de espermatozoides equinos que usen sin sistema de congelación de dos rampas a diferentes alturas del NL_2 dentro de un cryo-box podría ser una técnica barata, útil, fácil y práctica que podría aplicarse en condiciones de campo. Este sistema de doble rampa podría ser un método alternativo que permitiría generar una velocidad de enfriamiento inicial lenta y luego acelerar hasta la glasificación (Macedo et al., 2018). Sin embargo, estas velocidades de enfriamiento pueden provocar que la nucleación de hielo y la disipación del calor latente de fusión ocurran a menor o mayor tiempo y temperatura. La determinación de estos eventos podría determinar la eficacia en cada protocolo de congelación de manera que utiliza cajas criogénicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la eficacia de un protocolo de congelación de esperma equino que incluye dos rampas de congelación y velocidades de enfriamiento por aceleración, frente a un protocolo de congelación convencional que incluye velocidades de enfriamiento por desaceleración, y otro protocolo que incluye un biocongelador con velocidades programadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el momento exacto de la nucleación de hielo y la disipación del calor latente de fusión generado en cada protocolo de congelación.
- Evaluar las características cinéticas e integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos frescos-diluidos y congelados-descongelados, con los tres protocolos de criopreservación.

3. HIPÓTESIS

La criopreservación de espermatozoides equinos mediante un protocolo que use velocidades de enfriamiento por aceleración inicialmente bajas (Ej. 5 - 7 °C/min) generadas por dos rampas de congelación contenidas dentro de un cryo-box con NL2, permite obtener una mejor respuesta de criosupervivencia celular basado en una mejor cinética e integridad de las membranas espermáticas en comparación a un protocolo convencional (por desaceleración) y otro que mediante un biocongelador con velocidades programadas.

4. REVISION DE LA LITERATURA

Espermatogénesis

El espermatozoide se origina en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas:

- La multiplicación o mitosis de las espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número.
- La meiosis, en la que los espermatocitos primarios diploides dan lugar a los espermatocitos secundarios haploides.
- La espermiogénesis, en la cual un porcentaje de estas células sufre una serie de modificaciones (cambios en su morfología y pérdida de algunas de sus organelos) para transformarse en células diferenciadas, que son los espermatozoides.
- La capacitación: que es una última fase de maduración y activación que se produce durante su tránsito por el epidídimo ya que estas células haploides diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad.

La espermatogénesis tiene una duración en el caballo de 52 días. La participación de las células de Sertoli en la regulación y desarrollo de este proceso es de vital importancia, ya que proporcionan soporte estructural y nutricional a las células germinales entre otras funciones.

Los espermatozoides capacitados ya pueden alcanzar el ovocito, unirse a la zona pelúcida y experimentar un nuevo cambio, la reacción acrosómica. Las proteasas liberadas por el acrosoma, mediante exocitosis, degradan las glicoproteínas que envuelven la membrana plasmática del ovocito, permite que el espermatozoide fusione su núcleo con el del gameto de la hembra. (Gaxiola , 2019).

Espermatozoides equinos

Son células haploides con la única función de fecundación. Para llevarla a cabo, las células espermáticas tienen que iniciar y mantener el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva y las enzimas esenciales para el acrosoma para penetrar a través de las estructuras que envuelven al ovocito (Amman & Graham, 1993).

También es necesaria una adecuada distribución de lípidos en la membrana plasmática y el acrosoma, las cuales estabilizan esas estructuras hasta el momento de la fecundación y permiten también la fusión de las membranas en el momento apropiado. Además de esto, el mantenimiento de las proteínas de la membrana plasmática, es esencial para la sobrevivencia de los espermatozoides durante su transporte en el tracto genital femenino. Las proteínas suprimen la inmunidad local, proporcionan interacciones con las células epiteliales en determinadas regiones anatómicas y la adherencia de los espermatozoides a la membrana del ovocito en el momento de la fecundación. (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).

Anatomía espermática

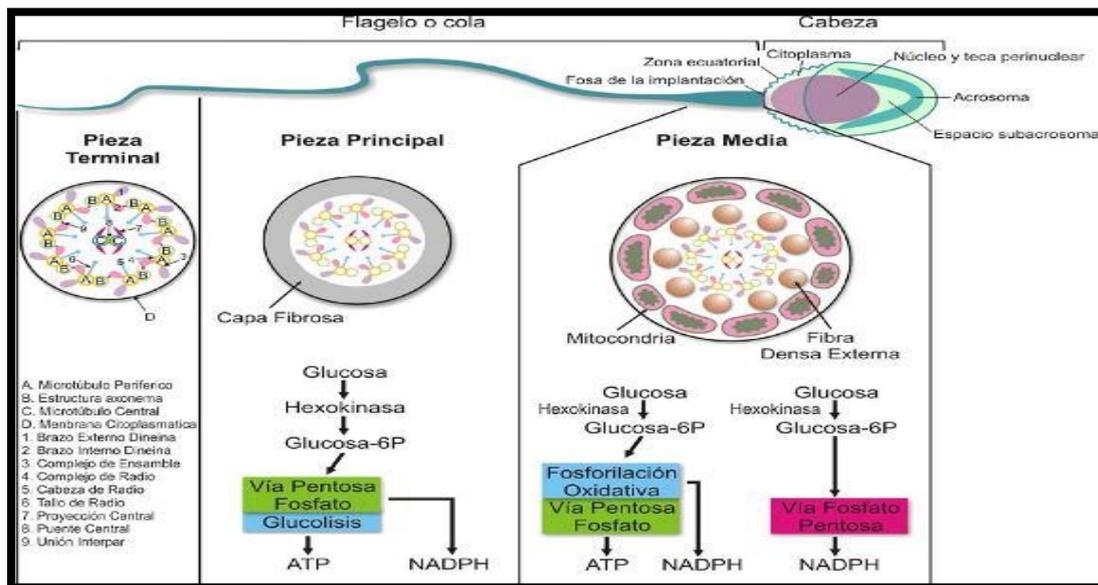


Figura 1: Morfología del espermatozoide y metabolismo energético que realiza esta célula a partir de glucosa en la pieza principal y en la pieza media.

Fuente: (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006)

El espermatozoide de los mamíferos consta de 5 regiones; cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Desde el punto de vista funcional, es un transportador de la información genética. Por ello, debemos destacar la presencia de un núcleo muy condensado, una membrana plasmática muy sensible a los cambios térmicos y osmóticos y las mitocondrias. (Ortega F. C., 2011).

La membrana plasmática: es una doble capa, compuesta fundamentalmente por lípidos, que recubre al espermatozoide. En condiciones normales, los grupos hidrófilos (cabezas) de los fosfolípidos de la membrana se disponen al momento de formarse las capas externa e interna de la bicapa lipídica, mientras que las colas hidrófobas se mantienen entre ambas capas. La deshidratación que ocurre durante la congelación, modifica esta disposición, esto hace que fuerce la coalescencia de las cabezas o la exposición de las colas. Los lípidos predominantes son los fosfolípidos y el colesterol. La composición de fosfolípidos de membrana y la relación colesterol/fosfolípidos difiere entre especies (aproximadamente 70% fosfolípidos, 25% lípidos neutros y un 5% de glicolípidos). La composición lipídica de la membrana está correlacionada con la tolerancia al shock por frío; cuanto mayor sea la proporción de esteroides en relación a los fosfolípidos y mayor sea la saturación de fosfolípidos con grupos acetilos, mayor tolerancia a los procesos de congelación-descongelación.

En estudios realizados por Parks y Lynch en 1992, se comprobó que la membrana plasmática del espermatozoide equino contiene menor porcentaje de colesterol que el de toro o el de cerdo. Esto les confiere menor tolerancia a los descensos de temperatura. La membrana plasmática consta además de una serie de proteínas integradas entre los lípidos. Estas proteínas actúan a modo de poros o canales, como receptores de unión a determinadas estructuras del aparato genital femenino (oviducto); como zona de unión específica de membrana, o bien presentan cadenas de carbohidratos que reaccionan con proteínas del medio.

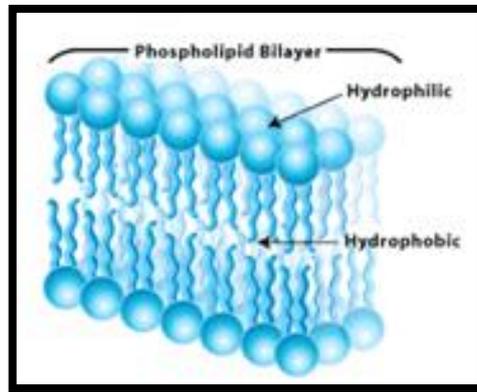


Figura 2: Membrana plasmática

Fuente: (Ortega F. C., 2011)

La cabeza del espermatozoide es aplanada y está formada por el núcleo, el acrosoma, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo está constituido por cromatina altamente condensada, el acrosoma, el segmento ecuatorial y la fosa de implantación (figura 3).

- La cromatina se encuentra compactada mediante proteínas específicas (protaminas) que se unen entre sí mediante puentes disulfuro.
- El acrosoma se localiza en la porción anterior del núcleo y es una vesícula especializada que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito en la fecundación. (Ortega F. C., 2011)

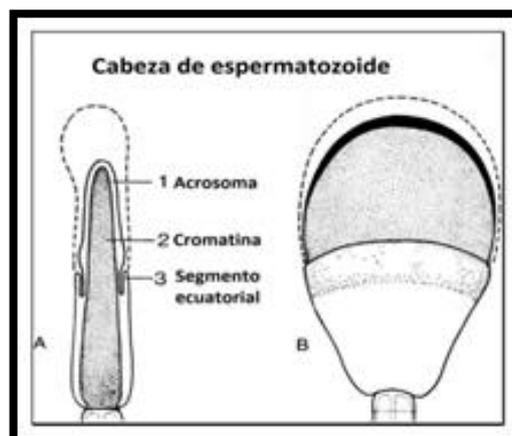


Figura 3: Cabeza del espermatozoide

Fuente: (Ortega et al., 2017)

El cuello es la unión entre la cabeza y la pieza intermedia. Está constituido por el capitulum, mitocondrias, el centriolo proximal y una serie de columnas laminadas que proporcionan gran flexibilidad al espermatozoide para moverse lateralmente durante la batida flagelar (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

El flagelo es el responsable del movimiento y lo constituyen tres regiones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. El flagelo está constituido en su totalidad por el "axonema" que es la estructura que le confiere el movimiento. El axonema está formado por una serie de microtúbulos agrupados en dobletes y se distribuyen en uno central y nueve periféricos (Figura 4).

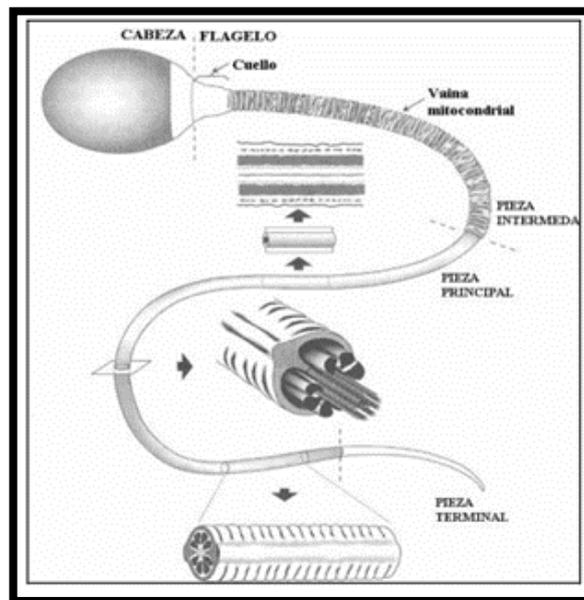


Figura 4: Cuello y Flagelo

Fuente: (Santiago-Moreno & Galarza, 2019)

Criopreservación del semen

Es una técnica que se basa en el enfriamiento de las células que llega hasta los -80 y -196°C así mediante se logra evitar el crecimiento bacteriano, el metabolismo espermático, control de acidificación y formación de reacciones de oxígeno permite conservar indefinidamente la muestra (Neira et al., 2007).

Gracias a los crioprotectores se ha podido realizar exitosamente las técnicas de criopreservación, que contienen una mezcla de proteínas y lípidos con un sin fin de sustancias como yema de huevo, proteínas de leche, leche de coco y más, el generalmente usado ha sido el glicerol y 1-2 propanediol, la función principal de los crioprotectores es que impide la formación de cristales al interior de la célula (Chenoweth & Lorton, 2014).

Diluyentes

Los diluyentes espermáticos tienen por objetivo contribuir en la reducción de lesiones e inducir a una mayor deshidratación celular y así evitar la formación de cristales durante la congelación. Los diluyentes como requisitos deben tener un pH con proximidad a la neutralidad y en su mayoría ser isotónicos, también deben contener los siguientes componentes: una sustancia orgánica que ayudará como crioprotector externo a proteger las células del shock frío, una fuente de energía, un componente tampón y finalmente un antibiótico (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

Entre los principales aditivos de los distintos diluyentes sobresale la yema de huevo que por sus amplios beneficios en la congelación espermática y su capacidad para proteger a la célula del shock frío le proporciona protección durante el proceso de congelación-descongelación. Se ha comprobado que su sustitución por otros aditivos afecta al descenso en la motilidad de espermatozoides después de la descongelación (Bagchi, Woods, & Critser, 2014).

El uso de diluyentes basados en Tris, ácido cítrico, yema de huevo y glicerol o en Tes, Tris, yema de huevo y glicerol han presentado resultados eficientes en la criopreservación espermática y la viabilidad-capacidad fertilizantes post descongelación (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

Actualmente se han realizado estudios de otro tipo de aditivos como los antioxidantes entre ellos los más usados: la vitamina C, el α -tocoferol, el superóxido dismutasa y diferentes carotenoides y polifenoles La L-carnitina en reportes previos ha demostrado desempeñar un papel protector contra las

especies reactivas de oxígeno, por sus propiedades antioxidantes, esto ayuda a mantener la actividad cinética espermática (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

Principios generales de la criopreservación

La historia de la criobiología data en el año 1940 en donde se verifican las primeras publicaciones de la criopreservación la cual consiste en el estudio de los efectos que producen las bajas temperaturas sobre células, órganos, tejidos, proteínas u organismos vivos; consecuentemente con los años se afirma que el frío tiene las capacidades de destruir tanto como preservar (Rivero Gonzalez, 2005). El proceso de cryopreservar muestras conlleva a que las mismas sufran cambios tanto físicos como químicos puede alterar su fisiología y como consecuencia causa daños letales, para sobrellevar esto se requiere de buenos manejos en los protocolos de congelación que nos permitan evitar al máximo los daños y obtener muestras con alta viabilidad

La finalidad de criopreservar espermatozoides es conservar su viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas normalmente a -196°C por períodos largos en nitrógeno líquido, a estas temperaturas bajo 0 la actividad metabólica se detiene, no se producen fenómenos de energía térmica o difusión obtiene preservación efectiva, sin embargo las muestras pueden sufrir daños al momento de congelar y descongelar, porque existe la formación de cristales de hielo al momento del enfriamiento (Gonzalo et al., 2009).

Los espermatozoides son células que están recubiertas por una membrana semipermeable que engloba agua y sales, y permite el paso de las mismas al momento del enfriamiento y se basa en dos principios físicos-químicos de la preservación en frío; una de ellas es el descenso crioscópico que tiene una propiedad coligativa, el agua pura se congela a los 0°C mientras que al incrementar sales se requerirá de temperaturas más bajas para lograr el mismo efecto; en cuanto al principio de ósmosis se refiere a que la membrana semipermeable permitirá una difusión pasiva en las que el soluto se dirige de concentraciones altas a concentraciones bajas para equilibrarse entre sí (Ávila P. L et al., 2006).

Criopreservación seminal y daños en el espermatozoide

La criopreservación es un proceso que se emplea en medicina reproductiva, para el mantenimiento a largo plazo de ovocitos, embriones y espermatozoides. A diferencia de los protocolos empleados en ovocitos o embriones, en los espermatozoides, se usan protocolos de descenso de temperatura relativamente lentos, dado su conformación aplanada (Ortega et al., 2017).

La congelación de semen consiste, en primer lugar, en la eliminación del plasma seminal mediante centrifugación. Posteriormente, las células se re suspenden en un diluyente de congelación, dejándolas un tiempo para que se equilibren. La mayoría de los diluyentes que incluyen crioprotectores, tienen una osmolaridad mucho mayor que las soluciones fisiológicas, para que el espermatozoide se deshidrate. Por ese motivo es necesario dejarle un tiempo de equilibrado con el crioprotector y minimizar así el daño debido a la deshidratación. Seguidamente, se procede al descenso de temperatura a un ritmo que viene determinado por el tamaño y permeabilidad de la célula, sumergiéndose finalmente en nitrógeno líquido (N₂) a -196 PC.

Durante este proceso los espermatozoides sufren una serie de daños letales y subletales (Watson, 2000), que son uno de los motivos de la baja fertilidad del semen descongelado equino. Estos daños se deben a cambios bruscos de temperatura y osmolaridad del medio, así como al estrés oxidativo que sufren. Tradicionalmente, se asociaba este daño a de "arado" y rotura de la membrana plasmática. Actualmente sabemos que el descenso de temperaturas a las que se someten los espermatozoides durante la congelación, evita en gran medida la formación de cristales de hielo, y que por ello el daño celular que sufre el espermatozoide se produce por el estrés osmótico y oxidativo (Morris et al., 2007). Por tanto, la calidad del semen congelado depende de la capacidad del espermatozoide para superar el proceso, sin perder sus principales funciones (viabilidad, motilidad y otros muchos atributos biológicos más complejos). Aunque el espermatozoide está sometido a diversos tipos de estrés cabe resaltar que existe una interconexión entre ellos y que, por lo tanto, su separación sólo tiene sentido desde el punto de vista didáctico. Todos estos cambios producen

muerte de los espermatozoides y daños subletales similares a la apoptosis (apoptosis-like) que disminuyen la vida media y la capacidad fecundante de las células (Ortega et al., 2017).

- a) **Shock osmótico:** durante el proceso, existen dos momentos críticos en los que los espermatozoides sufren este daño osmótico; uno al inicio del proceso los espermatozoides se diluyen en el medio de congelación, que es hiperosmolar. A medida que el proceso avanza y el agua del medio se congela, se produce un incremento relativo de solutos, que aumenta aún más la osmolaridad del medio. Por esta razón, los espermatozoides se deshidratan produciéndose una disminución de su volumen. Posteriormente, durante la descongelación, se produce un shock hiposmótico debido a que el medio recupera su osmolaridad inicial y los espermatozoides se hinchan de nuevo. Estos cambios de volumen afectan negativamente a la integridad de la membrana y al citoesqueleto de la célula.
- b) **Shock térmico:** Los cambios de temperatura inducen una transición de fase en los lípidos (fosfolípidos fundamentalmente) que componen las membranas plasmáticas, el acrosoma y las mitocondrias, esto origina cambios en la fluidez de las membranas y pérdida de su integridad y funcionalidad. De hecho, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los espermatozoides descongelados poseen una membrana plasmática mucho menos fluida y por tanto más rígida que los frescos, dado que, tras la descongelación, los eyaculados analizados mostraron un incremento en el porcentaje de baja fluorescencia de Merocianina-540 (Macías et al., 2011).
- c) **Estrés oxidativo:** La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) o "radicales libres" ocurre de forma fisiológica durante el metabolismo oxidativo de las células y juegan un papel importante en el funcionamiento normal del espermatozoide. Estas EROS, son moléculas de pequeño tamaño con una gran capacidad de difusión e interacción. A bajas concentraciones desarrollan funciones fisiológicas como la capacitación o hiperactivación celular (Macías et al., 2011); mientras que al producir desequilibrio en la producción o en los mecanismos

específicos de degradación de EROS, la función de los espermatozoides se ve afectada, como ocurre durante la congelación donde la mayor parte del plasma seminal que contiene las enzimas antioxidantes, se extrae.

Velocidades de enfriamiento lentas y rápidas

Las velocidades de congelación es uno de los factores más importantes al momento de criopreservar espermatozoides, la velocidad de enfriamiento es el que va a determinar los protocolos de criopreservación. (Fernández et al., 2009) En cuanto a las velocidades de enfriamiento se refiere, estas pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta, rápida, ultrarrápida y vitrificación (Boiso , 2001).

Al momento de congelar con NL_2 llegamos a una temperatura de $-196^{\circ}C$ en donde no se presentarán reacciones bioquímicas, pero existen daños que se dan como formación de cristales de hielo intracelular, descompensación de solutos y electrolitos, para evitar estos daños, al momento de la refrigeración - congelación sea muy rápido de $10 - 20^{\circ}C/min$ (Palacios , 1994)

Cuando las velocidades de enfriamiento son excesivamente lentas lo que se consigue es que la célula se deshidrata extremadamente llegando a colapsar siendo irreversible de la membrana (Boiso , 2001), una deshidratación severa provoca desnaturalización de las macromoléculas y una minimización del tamaño (Pérez et al., 2018).

En velocidades rápidas y ultrarrápidas se ha ido incorporando en las técnicas de criopreservación en los últimos tiempos, no se da un equilibrio osmótico en todo el tiempo de congelación de (Kato et al.,2012) la muestra, sino más bien un enfriamiento ultrarrápido en NL_2 y la rápida expuesta a vapores de NL_2 acompañado con una rápida deshidratación La técnica ultrarrápida se denomina vitrificación que desencadena formación de un estado vítreo que simula al cristal, dándonos ausencia de cristales de hielo intra y extra celular reduciendo el daño celular (Restrepo , Pizarro , & Alberto, 2012) las dificultades que puede darse por el uso de ésta técnica está que pueda sufrir choque osmótico debido al uso de soluciones hipertónicas, toxicidad por la alta cantidad de criopreservantes y alteraciones celulares que tienen relación directa con las bajas temperaturas (Restrepo , Gomez, & Vasquez, 2010).

Para lograr criopreservar con técnicas ultrarrápidas se requiere acompañar con crioprotectores que ayuden a incrementar la viscosidad del medio, sin embargo, los resultados obtenidos no son los mejores debido a la baja tolerancia de las células a las altas concentraciones de crioprotectores (Consuegra, 2019).

Velocidades de enfriamiento óptimas

Al saber que una velocidad excesivamente rápida y excesivamente lenta causa daños irreparables, se busca que la velocidad sea lo bastante rápido para evitar que el espermatozoide adquiera lesiones criogénicas dado por el efecto de la solución y lo suficientemente lento para que se deshidrate y no se forme hielo intracelular (Fernández et al.,2009).

Al hablar de congelación decimos que es el intercambio de líquidos a través de las membranas que interactúan con solutos y crioprotectores. Al descender las temperaturas se produce la formación de hielo en un cierto punto, lo que desencadena una reacción de congelación secuencial en toda la célula, durante este proceso hay liberación de calor denominado reacción exotérmica que permanece latente durante unos minutos y luego continúa con la congelación. Al desencadenarse este proceso, las sales de la célula se van a los espacios no congelados tendiendo a salir de ésta conjuntamente con el agua no congelada (Samper, Pycock, & McKinnon, 2007).

La supervivencia celular estará determinada por la congelación, especialmente en el rango crítico de temperatura que se define como el período en donde se va a formar los cristales de hielo, las lesiones que sufren los espermatozoides son dadas por estrés osmótico y presión dados por los cristales de hielo (Kumar, Millar , & Watson , 2003).

Factores determinantes de la crioresistencia

Dentro de los factores que influyen en la crioresistencia tenemos algunos como la misma composición de las membranas celulares, la composición del plasma seminal e inclusive el perfil de aminoácidos del plasma seminal puede ser un factor que determine una variabilidad en la crioresistencia, también se toma en cuenta el origen del esperma pudiendo haberse obtenido de origen

UCUENCA

epididimario o bien por eyaculación, los mismo que se sabe son más susceptibles a un choque por frío.

Entre otros factores también se considera el estatus endocrino del animal al momento de obtener la muestra, las acuaporinas específicamente las acuagliceroporinas como factores fundamentales en las respuestas celulares frente al proceso de congelación y descongelación (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Materiales físicos

- Guantes de examinación (látex)
- Mascarillas
- Caja de poliestireno de 19 x 30 x 31 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 termoprotectora para VA equina (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania).
- Rollo de papel secante
- Rollo de papel aluminio
- Termómetro digital
- Tubos Falcon de 15 mL
- Parafilm®M (Ref: P7793, Sigma-Aldrich)
- Lubricante K-Y Gel® (Ref: SKU 100021489, REBE)

5.1.2 Materiales Biológicos

- Equinos (caballos árabes)
- Eyaculados de Semen equino

5.1.3 Reactivos

- Glicerol (Ref: G9012, Sigma-Aldrich)

- Dimetilformamida (Ref: D119-4, Fisher scientific, Bélgica)
- Botusemen-Special® (SKU: 550/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- Botusemen-Gold® (SKU: 008/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- 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)
- Aglutinina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Bovine serum albumin, BSA (Sigma, A9418)
- Nitrogeno liquido

5.1.4 Materiales de Laboratorio

- Agua milli Q
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution 2018®, v.6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Microscopio para fluorescencia (Nikon Eclipse model 50i; negative contrast, excitación entre 450-490 nm, y emisión de 520 nm)
- Pipetas de 1 – 10 µl, 2 – 20 µl; 20 – 200 µl, y de 200 a 1000 µl
- Tubos falcon 15 ml
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubreobjetos
- Nevera
- Pajuelas 0,5 ml
- Esterilizador UV
- Caja de poliestireno de 31 x 30 x 29 cm
- Rampa de flotación doble a 24 y 10 cm de altura
- Unidad congeladora - Minitube® (Ref: 15043/0736, Minitub, GmbH, Tiefenbach, Germany)
- Tanque de nitrógeno líquido
- Microscopio de Epifluorescencia con contraste de fases con una.
- Baño María

- Incubadora Memmert
- Termocuple Digital thermometer® con sondas sensibles tipo K (Ref 6802 II)

5.2 Metodología

5.2.1 Área de estudio

La recolección de eyaculados se obtuvo de dos criaderos de caballos de raza árabe ubicados en la provincia del Azuay y Cañar. El análisis de las muestras espermáticas, procesamiento y criopreservación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la reproducción animal de la Universidad de Cuenca, ubicada en la Granja de Irquis, parroquia Victoria del Portete a 22 km de la ciudad de Cuenca.

5.2.2 Diseño Experimental

Esta investigación evaluó la eficacia de un nuevo protocolo de criopreservación para espermatozoides equinos, el cual a diferencia de los otros dos protocolos incluyó dos rampas de congelación dentro de una caja criogénica que fueron a expuestas a vapores de NL_2 , el primer protocolo se trabajó con una congelación convencional y el otro con un biocongelador con velocidades de enfriamiento programadas. Para este propósito, se utilizaron 24 eyaculados de semen provenientes de 4 caballos árabes (2 colectas semanales / caballo en 6 sesiones de recolección; y 6 eyaculados / caballo). Cada eyaculado se diluyó inicialmente 1:1 con el diluyente Botusemen-Special® atemperado a 37°C y luego se transportó al Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal en un tiempo inferior 120 minutos. En el laboratorio, cada muestra diluida fue centrifugada a 300 g (*gravidades*) durante 10 minutos, y el pellet recogido fue resuspendido con el diluyente Botusemen-Gold® y suplementado con una concentración final de 5% (v/v) de dimetilformamida (DMF) y 30×10^6 espermatozoides / mL. Estas muestras fueron refrigeradas durante 75 minutos a 5°C, y entonces empaquetadas en pajuelas de 0,5 mL, selladas y finalmente congeladas mediante tres protocolos por igual número (4 pajuelas / caballo [4 caballos] / sesión [6 sesiones]):

- **Protocolo 1**, Congelación convencional (**PCC-1**, n = 90 pajuelas): se usó de caja criogénica metálica de minitube de 53 (largo) x 33 (ancho) x 20 (alto) (con 8,4 L de NL₂, según las recomendaciones técnicas del fabricante) cm con una sola rampa de flotación a 5 cm del nivel de NL₂. Las pajuelas se colocaron en la rampa durante 10 minutos y entonces se dejó caer directamente en el NL₂.
- **Protocolo 2**, Congelación con 2 rampas (**PC2R-2**, n = 90 pajuelas): se usó una caja criogénica de 31 (largo) x 31 (ancho) x 30 (alto) cm (con 3,4 L de NL₂) con dos rampas, una a 17 cm del nivel de NL₂ durante 4 minutos, y otra a 2 cm del nivel de NL₂ durante 2 minutos y luego se dejó caer en el LN₂.
- **Protocolo 3**, Congelación con biocongelador programable (**PCBP-3**, n = 90 pajuelas): se usó un congelador TK 4000 TECNOLOGIA (Uberaba, Brasil) que tiene diseñado una velocidad inicial de 10°C/min desde 5°C a -10°C, seguida de una velocidad acelerada de 50°C/min desde -10°C hasta -140°C. Las pajuelas se colocaron en la rampa durante 10 minuto y entonces se dejó caer directamente en el NL₂.

Las muestras espermáticas frescas-diluidas y criopreservadas por los tres protocolos de criopreservación fueron analizados sus parámetros cinéticos e integridad de las membranas plasmática y acrosomal mediante el sistema CASA (SCA®) y la prueba de doble fluorescencia PI / PNA-FITC. Un total de 270 pajuelas (90 / Protocolo) fueron consideradas como unidades experimentales.

La variable independiente en esta investigación corresponde al protocolo de congelación (PCC-1, PC2R-2 y PCBP-3); y las variables de salida o dependientes serán los parámetros cinéticos (motilidades, velocidades, parámetros de relación y movimiento de cabeza y cola) e integridad de las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) (Figura 5).

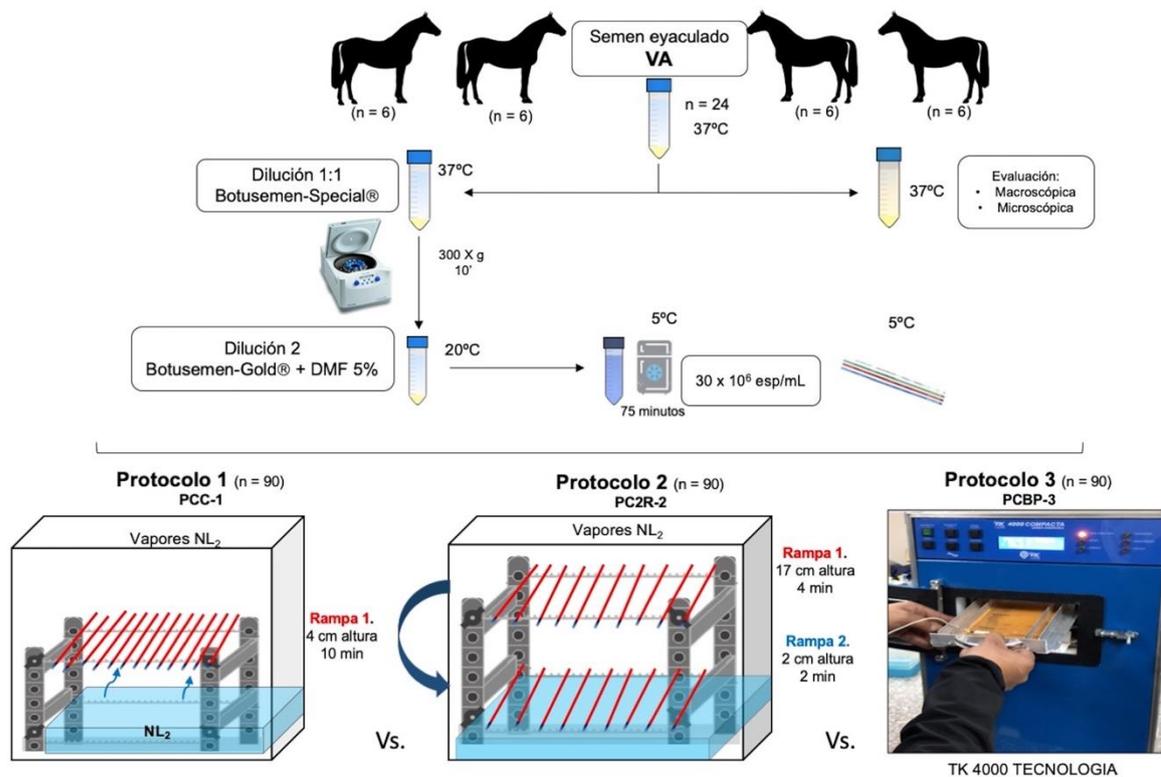


Figura 5. Diseño experimental de tres protocolos de congelación

5.2.3 Metodología para la investigación

5.2.3.1 Reproductores y recolección de semen

El proceso de recolección de semen se realizó en cuatro caballos árabes sexualmente adultos, clínicamente sanos pertenecientes a una finca del cantón Paute provincia del Azuay y una finca del sector Burgay provincia del Cañar. Las fincas “San Alfonso (Burgay) y San Juan (Paute)” son predios libres de Anemia Infecciosa Equina (AIE) certificado por Agrocalidad, y su calendario de desparasitación se lleva a cabo cada tres meses. Después de su entrenamiento semanal son administrados un complejo vitamínico. Los reproductores no presentan enfermedades del tracto reproductor ni en general, tienen actividad física tres días a la semana, su manejo es semi-intensivo en el cual tres días están a campo abierto y en la noche son estabulados en su pesebrera.

El proceso de recolección de semen se realizó dos veces por semana (2 eyaculado / semana / caballo) mediante una vagina artificial (VA) rígida tipo Hannover. La VA fue armada, lubricada y acondicionada a una temperatura entre

45 y 48°C. El envase de recolección contenía un filtro para retener la fracción gelatinosa del semen. 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 el diluyente Botusemen-Special® previamente atemperado a 37°C. Inmediatamente las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente (22°C) hasta el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal (en un tiempo máximo de 120 minutos) para su análisis inicial subsiguiente, procesamiento y criopreservación.

5.2.3.2 Concentración y procesamiento del semen

La concentración espermática de la primera muestra (fracción de eyaculado crudo o sin diluir) fue realizada mediante una cámara de Neubauer. Para este propósito, se usó una dilución 1:200 entre (3 µL) semen crudo – filtrado y solución salina formolada (600 µL); de esta mezcla se tomó 10 µL y se colocó sobre la cámara. El conteo de células se realizó en cinco cuadrantes observados en un microscopio de campo claro bajo el aumento de 40X. El total de células contadas en los cinco cuadrantes se multiplicó por 10^7 y el valor fue expresado en millones ($\times 10^6$ espermatozoides / mL). Consecuentemente, la motilidad inicial, así como los parámetros cinéticos fueron evaluados mediante el sistema CASA (Ver sección de análisis de calidad espermática).

Cada muestra espermática pre-diluida 1:1 de cada eyaculado se centrifugó a 300 g durante 10 minutos y el pellet obtenido fue re-suspendido con el diluyente Botusemen-Gold®. Cada solución resuspendida fue diluida con el mismo diluyente Botusemen-Gold® a concentración final de las muestras fueron de 30×10^6 espermatozoides / mL y 5% de dimetilformamida (DMF). Estas muestras se refrigeraron durante 75 minutos a 5°C y previo a su congelación, las muestras se cargaron en pajuelas de 0,5 mL debidamente identificadas y selladas con alcohol de polivinilo. Esta última acción se realizó en condiciones de frío para evitar la variación térmica y muerte celular.

5.2.3.3 Congelación y determinación de la nucleación del hielo

La nucleación de hielo y la disipación aparente del calor latente de fusión se realizó mediante el uso de un termómetro “Thermocouple Digital thermometer®” con sondas sensibles finas tipo K (Ref 6802 II). En cada protocolo de congelación se evaluó las temperaturas internas de las pajuelas (T_{in}). Para este propósito, se introdujo el termopar (sensor de temperatura) de alambre fino Tipo K dentro de una pajuela de 0,5 mL y se registró el descenso de la temperatura de la muestra por unidad de tiempo (segundo). El orificio se realizó cuidadosamente con la punta de una aguja y una vez que se introdujo dentro de la pajuela, el sensor se selló con cera (parafilm). La pajuela se colocó en las rampas de congelación de cada protocolo de criopreservación. Al iniciar la congelación, la temperatura inicial fue de +5°C (tiempo "cero") y desde entonces se registró el descenso de la temperatura / segundos. 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 (definido como el tiempo entre la nucleación del hielo y el retorno al mismo T_{in}). Para esta determinación, se registró el segundo exacto del suceso del ascenso de temperatura (equivalente a la nucleación de hielo o “*seeding*”) y luego se estimó la duración de la posterior disipación del calor latente de fusión de cada protocolo de congelación.

5.2.3.4 Protocolos de criopreservación

5.2.3.4.1 Protocolo 1- Convencional (PCC-1)

Este protocolo se realizó con la utilización de una “unidad congeladora - Minitube® (Ref: 15043/0736, Minitub, GmbH, Tiefenbach, Germany) que contiene una caja metálica aislada, contenedor de acero inoxidable de 53 (largo) x 32 (ancho) x 20 (alto), y una rampa de flotación. En la caja de acero inoxidable se colocó 8,4 L de NL_2 coincidente a 5 cm de altura desde su base. Luego de la aplicación del NL_2 se dejó 30 minutos con la tapa cerrada para estabilizar los vapores de NL_2 . Pasado ese tiempo, se coloca la rampa de flotación junto con las pajuelas sobre el nivel de NL_2 para que floten durante 10 minutos. Pasado

ese tiempo, las pajuelas se sumergen directamente dentro del NL_2 para alcanzar una temperatura de $-196^{\circ}C$.

5.2.3.4.2 Protocolo 2- Dos rampas (PC2R-2)

En este protocolo incluyó un cryo-box (caja criogénica de poliestireno) de 31 (largo) x 31 (ancho) x 30 (alto) y dos rampas fijas doble de congelación con dos alturas. Treinta minutos previos a la congelación, la caja criogénica se llenó con 3,4 L de NL_2 equivalente a 4 cm desde su base y se tapó para que los vapores de NL_2 se estabilicen. Al momento de la congelación, las pajuelas fueron colocadas inicialmente en Rampa 1 a 17 cm del nivel de NL_2 durante 4 minutos. Brevemente, las pajuelas fueron bajadas a la Rampa 2 a 2 cm del nivel del NL_2 con la utilización de una pinza larga (previamente fría), y permanecieron allí durante 2 minutos antes de sumergirlas al NL_2 para alcanzar una temperatura de $-196^{\circ}C$.

5.2.3.4.3 Protocolo 3- Velocidad programada (PCBP-3)

Este protocolo incluyó un biocongelador programable TK-4000 que usó una velocidad inicial de $10^{\circ}C/min$ desde $+5^{\circ}C$ a $-10^{\circ}C$, seguida de una velocidad acelerada de $50^{\circ}C/min$ desde $-10^{\circ}C$ hasta $-140^{\circ}C$. Posteriormente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en NL_2 para alcanzar una temperatura de $-196^{\circ}C$.

5.2.3.5 Análisis de calidad espermática

Las pajuelas de los tres protocolos de congelación fueron descongeladas sumergiéndolas en un Baño María a $37^{\circ}C$ durante 30 segundos. El contenido de cada pajuela descongelada fue recogido en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se dejó en incubación a $37^{\circ}C$ durante 5 minutos hasta la evaluación de su cinemática y la integridad de las membranas espermáticas.

5.2.3.5.1. Cinemática espermática

Las características cinemática de las muestras de semen de equino fresco y congelado-descongelado de los tres protocolos de congelación se analizaron mediante el sistema CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0

software, Microptic S.I., Barcelona, España), acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Para la evaluación se tomó 5 μ L de la muestra a analizar y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinéticas que se evaluaron fueron: motilidad total (MT, %) y progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad promedio (VAP, μ m/s), Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m).

5.2.3.5.2. Integridad de membranas espermáticas

Para la evaluación de las membranas, se descongeló la dosis del medio HEPES (250 μ L). Se preparó la tinción de fluorescencia con la mezcla de una dosis (100 μ L) de yoduro de propidio (PI) más una dosis de PNA-FITC aglutinina (100 μ L) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta su uso. Al medio HEPES descongelado y temperado a 22°C se adicionó 20 μ L de cada muestra de esperma.

Sin luz, se agregó 5 μ L de la mezcla de fluorescencia (PI / PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5 μ L de esa muestra y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia (Galarza et al., 2018). La viabilidad de los espermatozoides y el estado de la membrana acrosómica se analizó mediante microscopía de fluorescencia (se debe contar 200 células), con la utilización de un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.). La prueba de doble fluorescencia simultánea PI / FITC-PNA proporcionó para cuatro subcategorías: (1) porcentajes de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), (2) con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); (3) con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %); y (4) con membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA,

%). Adicionalmente, con estas subcategorías se calculó los porcentajes de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra, equivalente a viabilidad (IMP = IPIA + IPDA) y con membrana acrosomal íntegra (IMA = IPIA + DPIA).

5.2.3.6 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software Statistica para Windows v.12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, EE. UU.). Las variables espermáticas que no mostraron una distribución normal, según la prueba de *Shapiro-Wilk*, fueron transformadas en *Arcoseno* (valores porcentuales) o *Log10* (valores numéricos) antes del análisis. Los efectos de los protocolos congelación sobre la calidad espermática post-descongelación fueron comparados mediante ANOVA unidireccional con la utilización del procedimiento del modelo lineal general (GML). Además, el factor macho (reproductor) fue incluido como co-variable en este análisis debido a la variabilidad entre algunos caballos. Al momento que el ANOVA evidenció un efecto significativo, los valores se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey. Los resultados están presentados como media \pm SEM (error estándar de la media). El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Velocidades de enfriamiento y nucleación de hielo por protocolo

6.1.1. Protocolo 1 – PCC-1

El protocolo de congelación convencional produjo velocidades de enfriamiento por desaceleración. La nucleación del hielo (*seeding*) ocurrió en a $-13,8^{\circ}\text{C}$ y la disipación aparente del calor latente de fusión fue extremadamente rápido, desde los 15 s hasta los 18 s, a una velocidad de enfriamiento alta de $-63,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, estos valores deben considerarse como media de todas las variables evaluadas en el protocolo 1, en general, produjo las siguientes velocidades de enfriamiento promedio (Figura 6):

- Inicial a $55,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de $+5^{\circ}\text{C}$ a -40°C ;
- Intermedia a $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -40°C hasta $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$; y
- Final a $9,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -80 a $-163^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

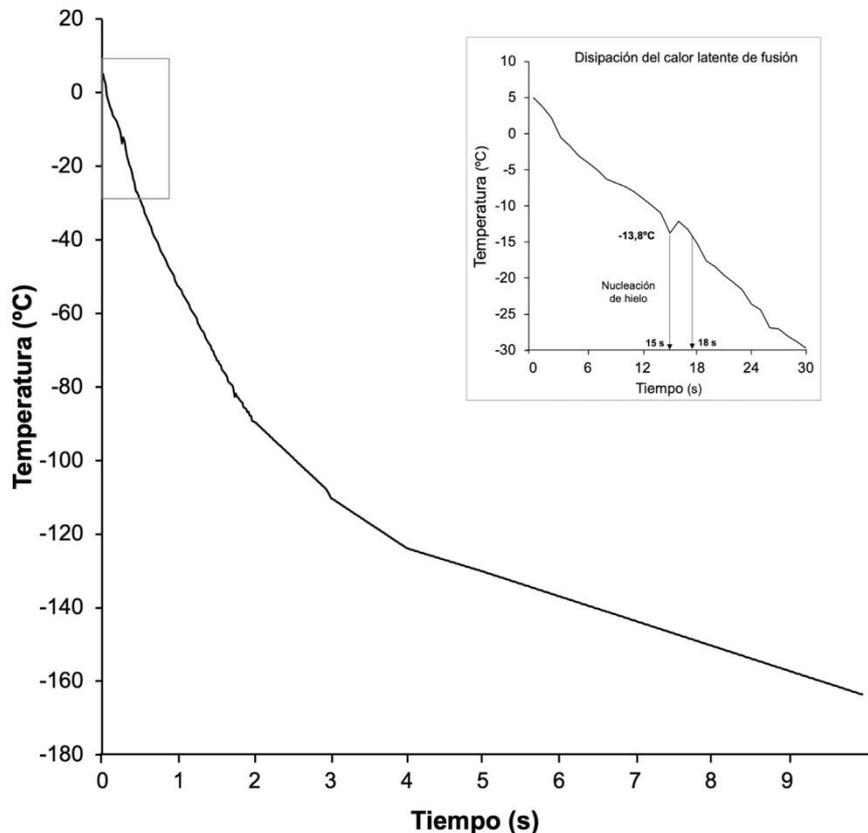


Figura 6. Curva de congelamiento del protocolo de congelación PCC1-1. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño.

6.1.2. Protocolo 2 – PC2R-2

El protocolo de congelación de dos rampas a diferentes alturas del nivel de NL_2 , dentro de una caja criogénica produjo velocidades de enfriamiento por aceleración. La nucleación del hielo (*seeding*) ocurrió en a $-8,5^{\circ}C$ y la disipación aparente del calor latente de fusión inició a los 15 s del descenso de temperatura hasta los 43 s, a una velocidad de enfriamiento lenta de $-9,17^{\circ}C/min$. Estos valores deben considerarse como media de todas las variables evaluadas en el protocolo 2, en general, produjo las siguientes velocidades de enfriamiento promedios (Figura 7):

- Rampa 1 a **$19^{\circ}C/min$** de $+5^{\circ}C$ a $-74^{\circ}C$; y
- Rampa 2 a **$47^{\circ}C/min$** de $-74^{\circ}C$ a $-168^{\circ}C$

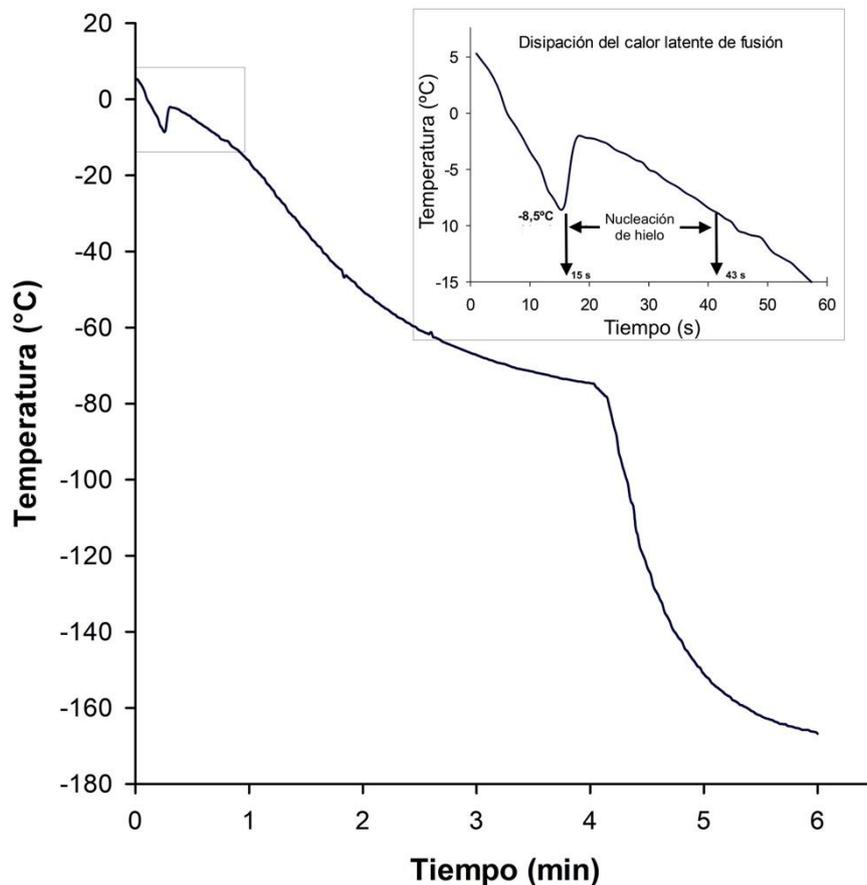


Figura 7. Curva de congelamiento del protocolo de congelación PC2R-2. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño

6.1.3. Protocolo 3 – PCBP-3

El protocolo de congelación con un congelador programable TK 4000 produjo velocidades de enfriamiento por aceleración. La nucleación del hielo (*seeding*) ocurrió en a $-5,9^{\circ}\text{C}$ y la disipación aparente del calor latente de fusión inició a los 55 s del descenso de temperatura hasta los 70 s, a una velocidad de enfriamiento de $-11,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Estos valores deben considerarse como media de todas las variables evaluadas en el protocolo 3, en general, produjo las siguientes velocidades de enfriamiento promedios (Figura 8):

- Rampa 1 a **$12,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$** de $+7,7^{\circ}\text{C}$ hasta -10°C ;
- Rampa 2 a **$15^{\circ}\text{C}/\text{min}$** de -10°C hasta $-34,1^{\circ}\text{C}$; y
- Rampa 3 a **$32,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$** de $-34,1^{\circ}\text{C}$ hasta $-140^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

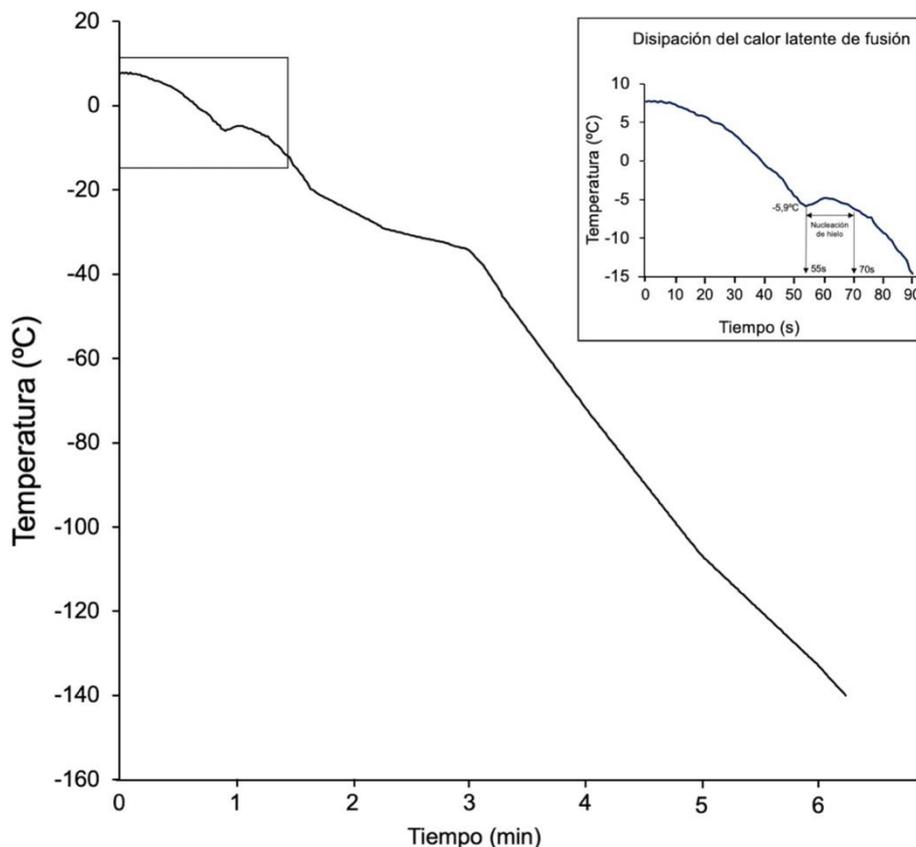


Figura 8. Curva de congelamiento del protocolo de congelación PCBP-3. El tiempo de duración y la temperatura a la que se produce el calor latente de fusión (nucleación del hielo) dentro de las pajuelas se muestran en el recuadro pequeño

6.2. Efecto de los protocolos congelación sobre calidad espermática

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 – diluidas y criopreservadas con los tres protocolos de congelación (PCC-1, PC2R-2, y PCBP-3) por reproductor se muestran en los Anexos 1 – 4.

6.2.1. Cinemática espermática

El análisis de efectos principales demostró que factor ‘reproductor’ influyó en algunos parámetros cinéticos tales como las motilidades MT y MP, VCL, parámetros de progresión (STR, LIN y WOB) y ALH, al demostrar diferencias significativas ($P < 0,001$) entre caballos.

En general, a excepción de STR y LIN, todos los demás parámetros de motilidad y cinética fueron afectados por el proceso de criopreservación, independientemente del protocolo usado, al demostrar la reducción significativa ($P < 0,01$) de sus valores.

Después en el los resultados obtenidos en el proceso de congelación y descongelación, se determinó que no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre protocolos de congelación (PCC-1, PC2R-2, y PCBP-3) en los parámetros cinemáticos tales como MT (respectivamente, $54,0 \pm 1,93$; $52,0 \pm 2,58$; $51,6 \pm 2,21\%$), MP ($27,6 \pm 1,70$; $25,8 \pm 1,78$; y $24,9 \pm 1,62\%$), VCL ($61,6 \pm 2,05$; $61,9 \pm 2,13$; y $59,9 \pm 1,96 \mu\text{m/s}$), VAP ($32,5 \pm 1,33$; $32,7 \pm 1,29$; y $31,0 \pm 1,25 \mu\text{m/s}$), VSL ($25,3 \pm 1,15$; $25,3 \pm 1,23$; y $23,4 \pm 1,06 \mu\text{m/s}$), WOB ($50,8 \pm 0,83$; $51,5 \pm 0,78$; y $50,0 \pm 0,88\%$), ALH ($2,6 \pm 0,06$; $2,6 \pm 0,08$; y $2,6 \pm 0,07 \mu\text{m}$) y BCF ($8,9 \pm 0,27$; $8,5 \pm 0,28$; y $8,3 \pm 0,28\text{Hz}$) (Ver Figuras 9 – 11).

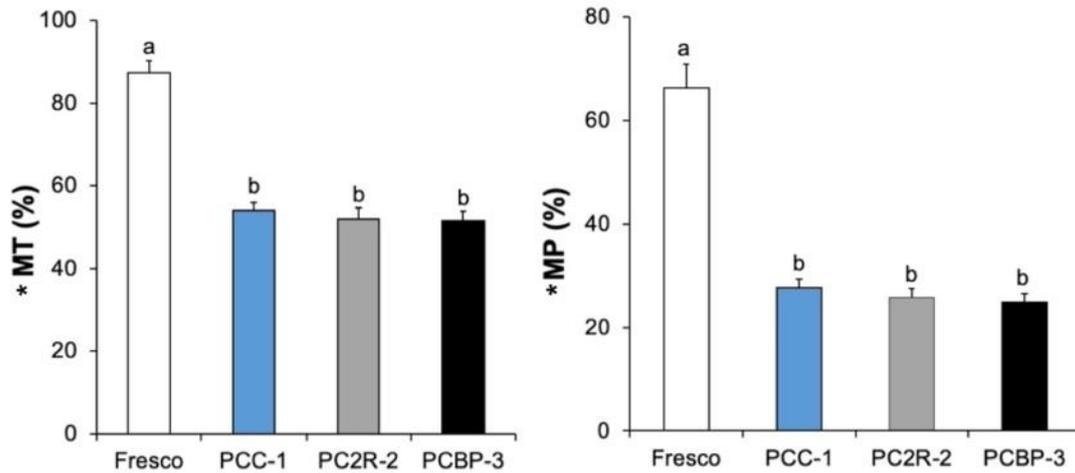


Figura 9. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$).

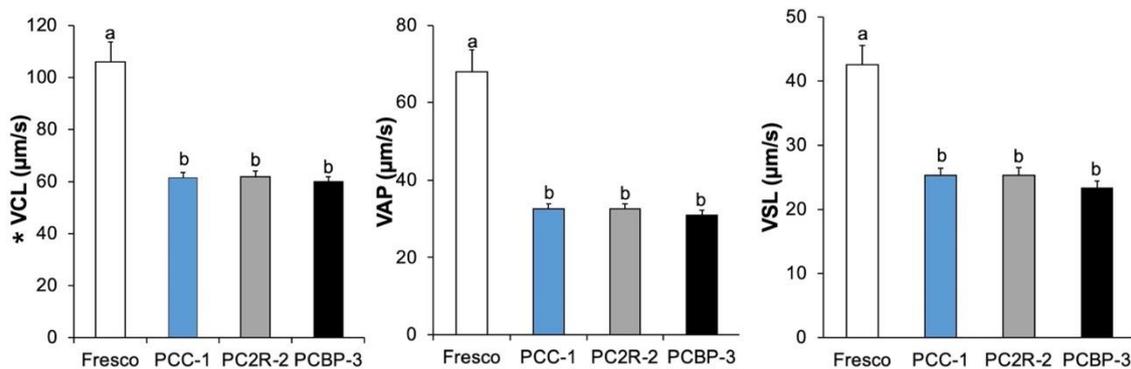


Figura 10: Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$).

En caso del STR, los espermatozoides congelados con los tres protocolos de criopreservación mostraron un incremento significativo ($P < 0,01$) de sus valores después de la descongelación, comparado con su contraparte fresco. Por otro lado, la LIN únicamente las muestras criopreservadas con el protocolo

PCBP-3 mostraron una reducción significativa ($P < 0,001$) de sus valores comparado con las muestras frescas (Figura 11).

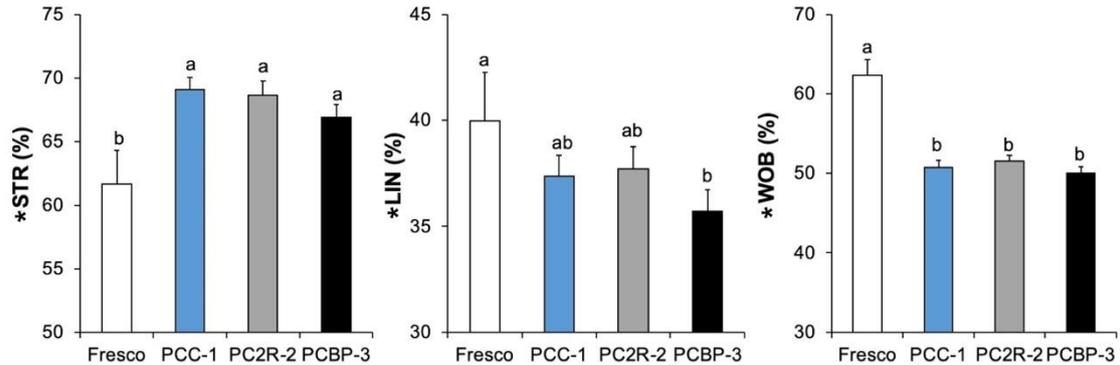


Figura 11. Parámetros de progresión como la rectitud (STR), linealidad (%) y oscilación (WOB) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$).

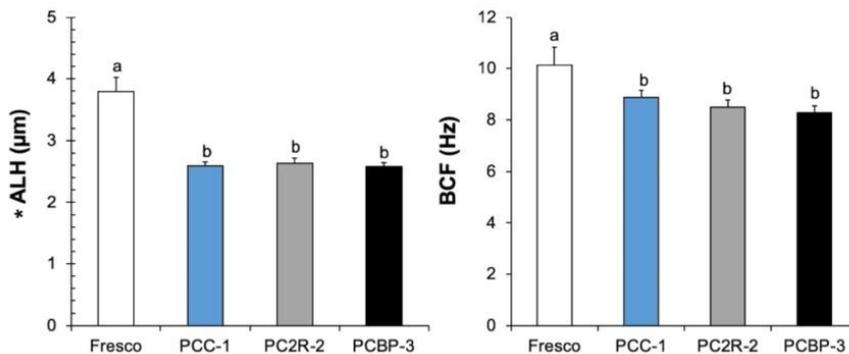


Figura 12: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de flagelo (BCF) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b, $P < 0,001$).

6.2.2. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal

El análisis de efectos principales demostró que factor 'Reproductor' influyó en el porcentaje de algunas subcategorías de integridad de membranas espermáticas como la IPIA, DPIA y e IMP (% viabilidad) al demostrar diferencias significativas ($P < 0,001$) entre caballos.

El porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA), así como el total de espermatozoides con membrana plasmática (IMP) y acrosomal (IMA) intacta redujeron ($P < 0,001$) sus valores después del proceso de criopreservación comparados con sus valores antes de la congelación (frescos) (Ver figuras 13 – 14).

En cuanto a las subcategorías de integridad simultánea de membrana plasmática y acrosomal, se determinó que los porcentajes de IPIA no difieren significativamente ($P > 0,05$) entre los protocolos de congelación PCC1, PC2R-2 y PCBP-3 ($53,1 \pm 1,26$; $56,2 \pm 1,03$; y $55,8 \pm 0,97\%$). Estos resultados post-descongelación indican el porcentaje de espermatozoides intactos que serían capaces de fertilizar los óvulos maduros debido a su integridad estructural y funcional. Asimismo, estos resultados sugieren que al congelar con el protocolo PC2R-2 en una caja criogénica de poliestireno con una cantidad mínima de nitrógeno y con dos rampas de enfriamiento, produce el mismo porcentaje de IPIA que aquellas muestras congeladas con un protocolo convencional (PCC-1) o un congelador con velocidades de enfriamiento programadas (PCBP-3).

Como era de esperarse, las subcategorías indeseables IPDA, DPIA y DPDA incrementaron ($P < 0,01$) sus porcentajes de espermatozoides después de la congeación con los tres protocolos. Sin embargo, se denota que aquellas muestras congeladas con los protocolos PC2R-2 y PCBP-3 mostraron un menor porcentaje de espermatozoides indeseables DPDA (muertos y con acrosoma dañado) en comparación con el protocolo convencional PCC-1 (Figura 13).

Al igual que la IPIA, después de la descongelación, la integridad total de la membrana plasmática (IMP) equivalente a la viabilidad (% vivos) fue similar entre los protocolos PCC-1, PC2R-2 y PCBP-3 (respectivamente, $57,4 \pm 1,21$; $59,2 \pm 0,99$; y $58,2 \pm 0,88$ %). Sin embargo, la integridad total de la membrana

acrosomal (IMA) post-descongelación, a pesar de que fue alta, fue mayor en las muestras congeladas con PC2R-2 y PCBP-3 comparados con aquellas muestras congeladas con el protocolo convencional PCC-1 ($93,2\pm 0,30\%$ y $94,5\pm 0,26\%$ vs. $89,7\pm 0,51\%$, respectivamente) (Figura 14).

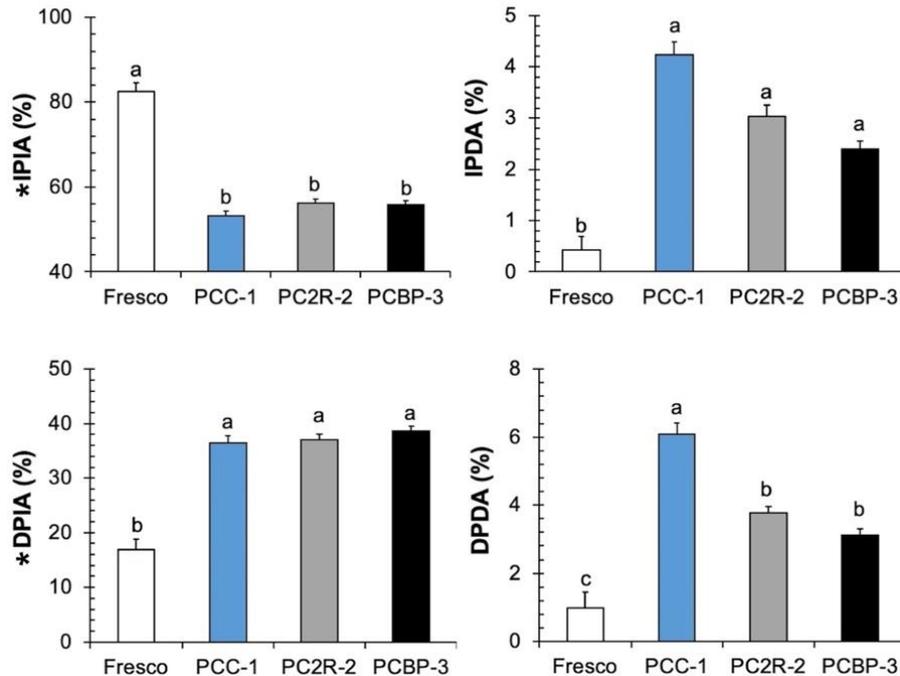
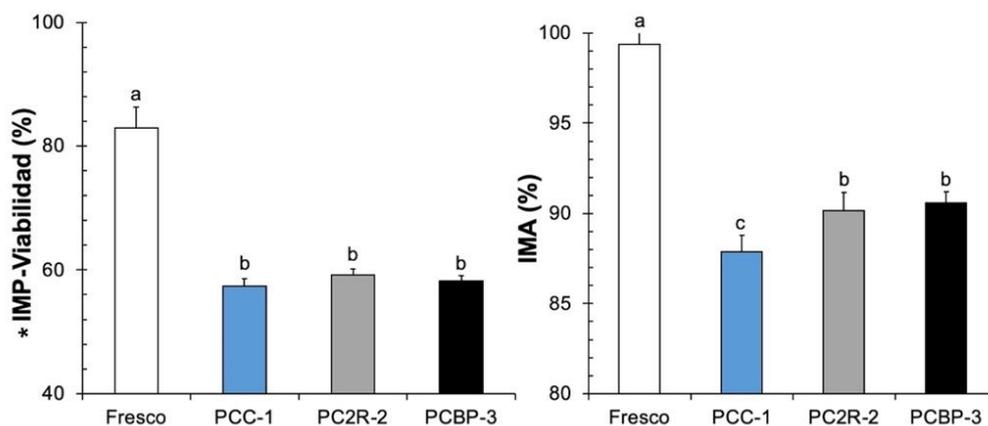


Figura 13. Porcentajes de espermatozoides en las distintas categorías de integridad de la membrana (evaluadas con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,01$; a-c, $P < 0,001$).



UCUENCA

Figura 14. Integridad de la membrana plasmática (IMP, %) y acrosomal (IMA, %) de muestras frescas y congeladas con los tres protocolos de congelación. La presencia de asterisco en cada parámetro indica diferencias significativas entre reproductores (* $P < 0,001$). Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas (a-b-c, $P < 0,01$; a-c, $P < 0,001$).

6. DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación indican que el protocolo de congelación de esperma equino que incluye dos rampas de congelación y velocidades de enfriamiento por aceleración produjo una criosupervivencia espermática similar que aquellos protocolos de congelación ya sea de uso convencional o programable (ambos patentados). De hecho, la nucleación de hielo en el PC2R-2 ocurrió a los $-8,5^{\circ}\text{C}$ y la disipación del calor latente de fusión duró 28 segundos produciendo una velocidad inicial lenta en ese momento de $9,17^{\circ}\text{C}/\text{min}$; una velocidad más lenta que los protocolos PCC-1 ($63,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y PCBP-3 ($11,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$). A pesar de producir la misma cinemática e integridad de membranas espermáticas post-descongelación, el protocolo de dos rampas se hace más atractivo y fácil al momento de usarlo debido a menor consumo de NL_2 . El hecho de tener dos alturas dentro del cryo-box permite que ocurran dos velocidades de enfriamiento por aceleración, hay que tener en cuenta que la primera rampa proporcionará una velocidad más lenta debido a la mayor distancia con NL_2 , y la segunda rampa proporcionará una velocidad más alta (debido a la proximidad con el NL_2 (Palacios , 1994). La nucleación de hielo y la disipación del calor latente de fusión serán más lentas y de este modo la célula podrá deshidratarse eficientemente, esto ayuda a prevenir la formación de cristales de hielo intracelular (letales) en la mayoría de células (Bailey et al., 2000). (Mazur, 1990).

La velocidad de congelación óptima es extremadamente importante para mantener la integridad celular porque determina si los espermatozoides permanecerán en equilibrio con su entorno extracelular o se sobreenfriarán progresivamente con la posibilidad creciente de formación de hielo intracelular (Kumar et al., 2003). Mazur (1990) indicó que la letalidad que las células alcanzan es a -30°C debido a la cantidad de agua osmóticamente activa que permanece dentro de los espermatozoides hasta esa temperatura; luego de ello, es agua se transforma en cristales de hielo intracelular (letal) y extracelular. Durante el enfriamiento lento, la deshidratación de los espermatozoides puede avanzar hasta el punto de equilibrio osmótico entre el espacio intracelular y

extracelular con una deshidratación celular máxima, a menudo perjudicial. Sin embargo, aumentar demasiado la velocidad de enfriamiento no evitará la formación de hielo intracelular debido a la deshidratación lenta (Pommer et al., 2022; Salazar et al., 2011). La criosupervivencia de las células se reduce si la velocidad de enfriamiento utilizada es subóptima. Después de la nucleación del hielo, si las células se enfrían demasiado rápido, el agua intracelular se congelará y provocará la formación de hielo intracelular. Sin embargo, si los espermatozoides se enfrían demasiado lentamente, se produce una deshidratación y un encogimiento excesivos de las células, lo que provoca daños irreversibles subletales en la membrana plasmática y otros componentes celulares, lo que reduce la capacidad fertilizante de los espermatozoides equinos (Maziero et al., 2013). Estas criolesiones se atribuyen a la alteración de los estados funcionales de la membrana plasmática resultantes de eventos de separación de fases en las bicapas lipídicas, alteraciones en las propiedades de transporte de agua y alteración física de la plasmalema espermática y las membranas acrosómicas (Devireddy et al., 2002; Aurich, 2005).

Los resultados de la presente investigación son consistentes a lo detallado por Woelders y Chaveiro, (2004) en el cual sugieren usar velocidades de enfriamiento lentas al inicio de la congelación y luego de la nucleación de hielo acelerar. En este sentido, el protocolo de dos rampas produjo velocidades de enfriamiento por aceleración (19°C/min y 47°C/min) siendo consistente con otras investigaciones que usaron velocidades de enfriamiento por aceleración y obtuvieron mejor respuesta espermática post-descongelación en espermatozoides de animales doméstico y silvestres (Esteso et al., 2018; Galarza et al., 2019a, 2019b). En la criopreservación de esperma equino realizado con velocidades inicialmente lentas y luego aceleradas, produce una mayor motilidad y viabilidad posterior a la descongelación en comparación con las velocidades altas (Cochran et al., 1984; Moore et al., 2006). De hecho, Vasconcelos-Franco et al. (2014) reportó que la supervivencia criogénica de los espermatozoides equinos mejora cuando se usa velocidad de enfriamiento de 5°C/min desde +5°C hasta -15°C. Por otro lado, se ha reportado que los espermatozoides equinos se pueden enfriar en una amplia gama de velocidades de enfriamiento, de 5 a 45 °C/min, mientras se mantienen los porcentajes

óptimos de espermatozoides móviles y viables (Moore et al., 2006; Clulow et al., 2008). Devireddy et al. (2002) determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido que los espermatozoides de sementales sobreviven de manera similar a velocidades de enfriamiento entre 20 y 100 °C/min. Heitland et al. (1996) demostraron que la viabilidad posterior a la descongelación de los espermatozoides equinos en diluyentes a base de yema de huevo se optimizó cuando se utilizó una velocidad de enfriamiento rápida; nuestro estudio demostró que tanto velocidades lentas (o moderadas: 12 a 19°C/min) como rápidas (59°C/min) dio como resultado una cinemática e integridad de membrana plasmática similar después de la descongelación.

Según Mazur (1990) se produce una pérdida de viabilidad celular cuando más del 10 % al 15 % del agua permanece dentro de los espermatozoides, porque a esta alta concentración, el agua forma cristales de hielo intracelulares cuando se enfría. El volumen de agua atrapada dentro de los espermatozoides enfriados a 5 °C/min, 20 °C/min y 50 °C/min fue del 1,6 %, 3,4 % y 4,6 %, mucho menos de lo que se ha propuesto como letal (Nash, 1996). En la presente investigación, el rango de velocidades de enfriamiento iniciales de los tres protocolos fue desde 12,8°C/min hasta 55,8°C/min).

Esto explica los resultados obtenidos en la presente investigación ya que los tres protocolos usaron velocidades iniciales diferentes (55,8°C/min, 19,0°C/min y 12,8°C/min, respectivamente para PCC-1, PC2R-2 y PCBP-3) y se obtuvo la misma cinemática espermática y la misma integridad de membrana plasmática. No obstante, los protocolos de dos rampas (PC2R-2) y del congelador programable (PCBP-3) produjeron una mayor proporción de espermatozoides con membrana acrosómica intacta y un menor porcentaje de espermatozoides dañados simultáneamente el plasmalema y acrosoma (DPDA) que el protocolo convencional (PCC-1).

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que un protocolo de criopreservación de espermatozoides equinos basado en dos rampas de congelamiento a diferente altura (17 y 2 cm del nivel del NL₂) mantenidos dentro de una caja criogénica produjo velocidades de enfriamiento aceleradas y una criosupervivencia espermática similar a los protocolos comerciales, ya sea de congelación convencional o de velocidades programadas. El protocolo de dos rampas de congelación resulta una alternativa exitosa para congelar semen equino debido a su fácil aplicación, eficacia y menos consumo de NL₂

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios similares, con el fin de conocer como la eficacia de un protocolo de congelación de esperma equino que incluye dos rampas de congelación y velocidades de enfriamiento por aceleración, los cuales ayuden a obtener resultados actualizados.
- Realizar nuevas investigaciones con diferentes especies incluyendo los equinos.
- Evaluar la fertilidad del semen procesado mediante este nuevo protocolo.

Bibliografía

- Ávila, P. L., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Scielo*, 57(4), 10. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>
- Alvarenga, M. A., Ozanam , P. F., & Rámires, N. C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *National Center for Biotechnology Information*, 59. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27726989/>
- Ávila, P. L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Lozano, J. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Scielo*, 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000, January 2). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
- Bagchi, A., Woods, E., & Critser, J. (2014). Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Tandfonline*, 30. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17434440.5.3.359>
- Boiso , I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Fertilidad*, 18(4), 9. Obtenido de http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert%20Jul_Ag01-Ponen3.pdf
- Buzón , C. A. (2013). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer*. Tesis de grado , Unidad de Córdoba , Córdoba. Obtenido de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/11586/2014000000902.pdf?sequence=>

Castro , M. K., & González , C. S. (2018). Modern Methods Of Seminal Evaluation In Equine. *Universidad Cooperativa de Colombia*, 29. Obtenido de https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/12318/1/2019_metodos_modernos_evaluacion.pdf

Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). *Animal andrology: theories and applications*. CABI, 29.

Consuegra, C. (2019). *Vitrificación de espermatozoides de caballo empleando crioprotectores no penetrantes*. Tesis de grado , Universidad de Córdoba , Córdoba. Obtenido de <https://helvia.uco.es/handle/10396/18596#:~:text=La%20vitrificaci%C3%B3n%20de%20espermatozoides,en%20la%20congelaci%C3%B3n%20lenta%20tradicional>.

Cruz , C. P., Medina, R. V., & Velasco , S. Y. (2016). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Scielo*, 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000200006

De Leeuw , F., De Leeuw , A., Den Daas , J., Colenbrander , B., & Verkleij , A. (2016). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *National Center for biotechnology information*, 56. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8440128/>

Domingo Pérez, D. Q., Acosta, M. L., Restrepo, G. B., Camacho, C., & Pérez, J. O. (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida FREEZING OF EQUINE SEMEN UNDER TWO SCHEMES OF ADDITION OF DIMETHYLFORMAMIDE. *Rev Inv Vet Perú*, 28(4), 918–927. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13884>

Elgueta , V. C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. Tesis de grado , Universidad de las Américas

, Chile. Obtenido de <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Elizabeth Varela, G., Duque C, J. E., Ramírez H, M., Ocampo V, D., Montoya P, J. D., & Restrepo B, G. (2015). Efecto de Cuatro Métodos de Separación Seminal sobre la Calidad y la Capacidad Fertilizante in vitro de Espermatozoides Equinos Criopreservados. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(3), 451–461. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V26I3.11188>

Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, D. R., Zamora, S., Roldán, M., . . . Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Dialnet*, 14, 29. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7136070>

Fernandez, J. (2018). Procedimientos de congelación y descongelación. *Kryosfera*. Obtenido de <https://www.kryosfera.com/procedimientos-de-congelacion-y-descongelacion>

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.

Gaxiola, S. C. (2019). *Motilidad progresiva del semen equino post descongelación usando dos criopreservadores*. Tesis de grado, Universidad Autónoma de Baja California, México. Obtenido de <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2719/1/VET008348.pdf>

Gonzalo, M. del C., Zamora, S., Roldán, María, Rabelo, M., Ramírez, J. P., Yoldi, A., & Castilla, J. A. (2009). FUNDAMENTOS DE CRIOBIOLOGÍA ESPERMÁTICA PARA BANCOS DE SEMEN | Revista Asebir. *Revista Asebir*, 8–11. <https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia->

- Gutiérrez, C. L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal*. Tesis doctoral , Universidad Complutense de Madrid , Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24898/1/T35236.pdf>
- Juárez , M. J. (2019). *Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcino*. Tesis de grado , Universidad Politécnica de Valencia , Valencia. Obtenido de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14361/TesinaMaster_JorgeJuarez.pdf?sequence=1
- Kato , O., Kawasaki, N., Bodri, D., Kawachiya, S., Kato, K., & Takehara , Y. (2012). Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Ejog*, 161(1). Obtenido de [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(11\)00659-2/fulltext](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(11)00659-2/fulltext)
- Kumar, S., Millar , J. D., & Watson , P. F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *ScienceDirect*, 29. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224003000403?via%3Dihub>
- Macías , G. B., González , F. L., Ortega , F. C., Salazar, S. C., Morillo , R. A., Rodríguez , M. H., . . . Peña , F. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *National Library Medicine*, 35. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20456666/>
- Macedo, S., Bliedernicht, M., Carvalheira, J., Costa, A., Ribeiro, F., & Rocha, A. (2018). Effects of two freezing methods and two cryopreservation media on post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 519–524. <https://doi.org/10.1111/rda.13140>

<https://doi.org/10.1007/BF02989804>

Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 17(1),53-92.

Medina , R. V., Velasco , S. Y., & Cruz , C. P. (2015). Aspectos generales de la crioconservación espermática en equinos . *Scielo*, 18(1), 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902005000100005

Meryman, H. (1974). Freezing Injury and its Prevention in Living Cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 3:341-363, 36. Obtenido de <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.03.060174.002013>

Mesa, A., & Henao, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Scielo* , 17(1). Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682012000100014

Morillo , R. A. (2013). Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. *Dialnet*, 29. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=38177>

Morris, G., Faszer, K., Green, J., Draper, D., Grout, B., & Fonseca, F. (2007). Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Elsevier*, 38. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07003433>

NASH, T. (1966). *Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing*. . 1996. <https://www.jstor.org/stable/3860981>

Neira, J. A., Germán, /, Ramírez, F., Andrés, S., García, L., Andrés, D., & García,

M. (2007). <https://www.redalyc.org/pdf/951/95101408.pdf>.
<https://www.Redalyc.Org/Pdf/951/95101408.Pdf>, 95–97.
<http://redalyc.uaemex.mx>

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Scielo*, 19(4), 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008

Olivo, M. D. (2019). *Elaboración de un Proyecto en Metodología Marco Lógico de Producción del Ganado Caballar de la Unidad de Equitación y Remonta de la Policía Nacional del Ecuador*. Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20276/1/T-UCE-0014-MVE-080.pdf>

Ortega, F. C. (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 de grado, Universidad de Extremadura, México. Obtenido de <https://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494349.pdf>

Ortega, F. F., Anel, L. L., Martín, M. P., Ortíz, R. J., Alvarez, M., De Paz, P., . . . Peña, F. (2017). Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermtosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Society for Reproduction and Fertility*, 29. Obtenido de <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/153/3/293.xml>

Palacios, A. A. (1994). Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Medigraphic*, 4. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1994/vm943b.pdf>

Palma, G., & Brem, G. (2016). Biotecnología de la reproducción. *Scielo*, 25. Obtenido de http://www.reprobiotec.com/libro_azul/cap_01.pdf

- Pérez , O. J., Otero , A. R., Cardona, A. J., Ospitia, P., González, A., & Paredes , C. A. (2018). Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática en caballos criollos colombianos. *Unisucre*, 29. Obtenido de <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/631/pdf>
- Puga, T. T., Blum, R. X., Blum, N. M., Sorroza, R. N., Cajas, F. N., López, M. E., . . . Aray, A. M. (2018). Relation between basal sperm morphology and sperm recovered by swim up. *Recimundo*, 3(2), 89. Obtenido de <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/285>
- Quinn, P. (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Scienced*, 22(2), 35. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0011224085901671>
- RA, F.-G., EC, C., CF, R., AF, A., FF, B., & RP, A. (2012). Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44 Suppl 1(SUPPL.1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2010.01154>.
- Restrepo , B. G., Gomez, O. J., & Vasquez, A. N. (2010). Efectos de la vitrificación en pajilla abierta estirada sobre la fertilización in vitro de Oocitos Bovinos. *Redalyc*, 63(1), 29. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914617011>
- Restrepo , B. G., Pizarro , L. E., & Alberto, R. B. (2012). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Scielo*, 9(1), 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000100013#:~:text=El%20estr%C3%A9s%20oxidativo%20puede%20considerarse,la%20naturaleza%20qu%C3%ADmica%20de%20los
- Restrepo , B. G., Usuga , S. A., Montoya , P. J., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen

de caballos de la raza criollo colombiano. *Scielo*, 11(2), 29. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492014000200008

Salazar, j., Teague, S., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T., & Varner, D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *ScienceDirect*, 49. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X11000963?via%3Dihub>

Samper, J., Pycock, J., & McKinnon, A. (2007). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-0252-3.X5001-2>

Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Elsevier (Animal Reproduction Sciece*, 12. Obtenido de <http://directory.umm.ac.id/Data%20Elmu/jurnal/A/Animal%20Reproductio n%20Science/Vol60-61.Issue1-4.Jul2000/1971.pdf>

Woelders, H., & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Pubmed*, 29. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15615612/>

Woolgar, A. (1974). Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: Relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements. En *Cryobiology* (pág. 175). London: Watford Road. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0011224074900376>

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

ANEXOS

Anexo 1. Valores promedios \pm SEM de los parámetros cinéticos del sistema CASA de las muestras frescas y criopreservadas por cada protocolo de congelación.

Parámetros Cinéticos	Fresco (n = 54)	Criopreservado - protocolos de criopreservación		
		PCC-1 (n = 69)	PC2R-2 (n = 49)	PCBP-3 (n = 57)
MT (%)	87,3 \pm 3,06	54,0 \pm 1,93	52,0 \pm 2,58	51,6 \pm 2,21
MP (%)	66,2 \pm 4,97	27,6 \pm 1,70	25,8 \pm 1,78	24,9 \pm 1,62
VCL (μ m/s)	106,0 \pm 7,52	61,6 \pm 2,05	61,9 \pm 2,13	59,9 \pm 1,96
VAP (μ m/s)	68,0 \pm 5,64	32,5 \pm 1,33	32,7 \pm 1,29	31,0 \pm 1,25
VSL (μ m/s)	42,5 \pm 2,95	25,3 \pm 1,15	25,3 \pm 1,23	23,4 \pm 1,06
STR (%)	61,7 \pm 2,63	69,1 \pm 0,97	68,6 \pm 1,11	66,9 \pm 1,01
LIN (%)	40,0 \pm 2,29	37,4 \pm 0,99	37,7 \pm 1,04	35,7 \pm 1,03
WOB (%)	62,3 \pm 1,98	50,8 \pm 0,83	51,5 \pm 0,78	50,0 \pm 0,88
ALH (μ m)	3,8 \pm 0,23	2,59 \pm 0,06	2,64 \pm 0,08	2,58 \pm 0,07
BCF (Hz=)	10,1 \pm 0,71	8,9 \pm 0,27	8,5 \pm 0,28	8,3 \pm 0,28

Anexo 2. Valores promedios \pm SEM de la Integridad simultánea y total de las membranas plasmáticas y acrosomal

Parámetros cinéticos	Fresco (n = 54)	Criopreservado - protocolos de criopreservación		
		PCC-1 (n = 63)	PC2R-2 (n = 52)	PCBP-3 (n = 58)
IPIA (%)	82,5 \pm 2,16	53,1 \pm 1,26	56,2 \pm 1,03	55,8 \pm 0,97
IPDA (%)	0,4 \pm 0,25	4,2 \pm 0,24	3,0 \pm 0,21	2,4 \pm 0,16
DPIA (%)	16,9 \pm 1,95	36,5 \pm 1,22	37,0 \pm 1,03	38,6 \pm 0,90
DPDA (%)	1,0 \pm 0,46	6,1 \pm 0,33	3,8 \pm 0,18	3,1 \pm 0,18
IMP (%)	82,9 \pm 2,12	57,4 \pm 1,21	59,2 \pm 0,99	58,2 \pm 0,88
IMA (%)	99,4 \pm 1,12	89,7 \pm 0,51	93,2 \pm 0,30	94,5 \pm 0,26

Anexo 3. Valores promedios \pm SEM de los parámetros cinéticos en muestras frescas y criopreservadas con los tres protocolos y por reproductor

SEMEN	PROTOCOLO	REPROD.	MT (%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	STR (%)	LIN (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)	n	
FRESCO	PCC-1	HIJO	96,1 \pm 0,97	78,3 \pm 3,50	114 \pm 5,5	59,1 \pm 3,89	39,0 \pm 1,24	66,4 \pm 2,03	36,3 \pm 1,69	53,2 \pm 2,55	4,60 \pm 0,21	11,0 \pm 0,73	6	
		NEGRO	86,8 \pm 2,62	59,5 \pm 2,93	103 \pm 7,3	61,0 \pm 5,13	33,3 \pm 1,86	55,8 \pm 1,72	33,8 \pm 0,79	58,2 \pm 1,31	3,62 \pm 0,18	10,5 \pm 0,47	6	
		PADRE	85,1 \pm 3,44	59,6 \pm 7,43	97 \pm 8,5	61,5 \pm 6,21	47,5 \pm 4,78	70,7 \pm 2,22	44,4 \pm 2,31	59,8 \pm 1,94	3,44 \pm 0,21	10,7 \pm 1,00	6	
	PC2R-2	HIJO	94,5 \pm 1,43	76,5 \pm 6,08	115 \pm 9,1	78,0 \pm 7,32	47,7 \pm 3,96	60,2 \pm 3,40	40,9 \pm 3,36	65,5 \pm 2,70	4,11 \pm 0,23	10,5 \pm 0,79	6	
		NEGRO	83,0 \pm 2,77	60,9 \pm 4,66	99 \pm 7,2	75,2 \pm 6,30	43,2 \pm 3,60	57,9 \pm 3,15	43,9 \pm 3,29	72,6 \pm 2,63	3,09 \pm 0,26	8,0 \pm 0,46	6	
		PADRE	74,3 \pm 8,69	53,7 \pm 9,29	92 \pm 10,5	65,4 \pm 7,18	44,5 \pm 3,60	65,3 \pm 2,05	45,5 \pm 1,58	66,6 \pm 1,94	3,35 \pm 0,35	8,4 \pm 0,84	6	
	PCBP-3	HIJO	97,0 \pm 0,99	82,4 \pm 1,14	122 \pm 2,3	70,3 \pm 3,11	44,1 \pm 2,01	61,4 \pm 2,74	35,9 \pm 1,84	57,0 \pm 1,72	4,39 \pm 0,12	12,1 \pm 0,57	6	
		NEGRO	85,1 \pm 2,53	61,8 \pm 2,69	111 \pm 6,8	72,0 \pm 5,11	35,4 \pm 1,58	51,4 \pm 3,58	32,9 \pm 2,50	62,2 \pm 1,12	3,94 \pm 0,22	10,1 \pm 0,62	6	
		PADRE	83,9 \pm 4,07	63,2 \pm 6,99	101 \pm 10,5	69,4 \pm 6,52	48,1 \pm 3,95	66,2 \pm 2,81	46,0 \pm 3,28	65,9 \pm 1,92	3,58 \pm 0,30	10,0 \pm 0,87	6	
	TOTAL, FRESCO			87,3 \pm 3,06	66,2 \pm 4,97	106 \pm 7,5	68,0 \pm 5,64	42,5 \pm 2,95	61,7 \pm 2,63	40,0 \pm 2,29	62,3 \pm 1,98	3,8 \pm 0,23	10,1 \pm 0,71	54
	CRIOPRESERVADO	PCC-1	HIJO	62,4 \pm 2,49	35,6 \pm 2,54	70 \pm 3,1	36,1 \pm 2,31	28,3 \pm 2,07	71,3 \pm 1,42	37,4 \pm 1,53	50,1 \pm 1,20	2,95 \pm 0,08	9,7 \pm 0,41	25
			NEGRO	55,4 \pm 2,81	28,2 \pm 2,72	64 \pm 3,5	34,1 \pm 2,30	25,3 \pm 1,94	66,7 \pm 1,39	35,9 \pm 1,47	50,7 \pm 1,25	2,64 \pm 0,10	9,0 \pm 0,53	23
PADRE			42,6 \pm 3,53	17,5 \pm 2,32	49 \pm 2,3	26,6 \pm 1,78	21,6 \pm 1,70	69,1 \pm 2,17	38,9 \pm 2,18	51,6 \pm 1,92	2,10 \pm 0,07	7,8 \pm 0,41	21	
TOTAL			54,0 \pm 1,93	27,6 \pm 1,70	62 \pm 2,1	32,5 \pm 1,33	25,3 \pm 1,15	69,1 \pm 0,97	37,4 \pm 0,99	50,8 \pm 0,83	2,59 \pm 0,06	8,9 \pm 0,27	69	
PC2R-2		HIJO	59,1 \pm 4,12	30,0 \pm 3,54	65 \pm 4,0	32,3 \pm 2,47	24,5 \pm 2,24	68,5 \pm 2,03	35,2 \pm 1,89	49,1 \pm 1,46	2,90 \pm 0,15	8,4 \pm 0,53	17	
		NEGRO	51,5 \pm 4,06	24,3 \pm 2,27	61 \pm 3,2	31,7 \pm 1,85	23,2 \pm 1,84	64,6 \pm 1,80	35,0 \pm 1,37	50,4 \pm 1,07	2,60 \pm 0,13	8,0 \pm 0,48	17	
		PADRE	44,5 \pm 4,80	22,7 \pm 3,18	60 \pm 4,0	34,2 \pm 2,45	28,5 \pm 2,21	73,4 \pm 1,19	43,6 \pm 1,22	55,5 \pm 0,98	2,38 \pm 0,11	9,2 \pm 0,46	15	
		TOTAL	52,0 \pm 2,58	25,8 \pm 1,78	62 \pm 2,1	32,7 \pm 1,29	25,3 \pm 1,23	68,6 \pm 1,11	37,7 \pm 1,04	51,5 \pm 0,78	2,64 \pm 0,08	8,5 \pm 0,29	49	
PCBP-3		HIJO	56,4 \pm 3,80	27,4 \pm 2,74	62 \pm 2,3	28,4 \pm 1,38	20,2 \pm 1,22	65,0 \pm 1,30	30,2 \pm 1,15	44,7 \pm 0,92	2,94 \pm 0,09	7,9 \pm 0,41	17	
		NEGRO	57,3 \pm 3,82	29,5 \pm 2,91	66 \pm 3,4	35,3 \pm 2,31	25,8 \pm 1,77	65,4 \pm 1,31	36,4 \pm 1,22	52,1 \pm 1,03	2,67 \pm 0,08	8,7 \pm 0,48	20	
		PADRE	41,8 \pm 2,88	18,2 \pm 2,21	52 \pm 3,5	28,9 \pm 2,21	23,7 \pm 2,11	70,0 \pm 2,20	39,8 \pm 2,06	52,4 \pm 1,82	2,19 \pm 0,11	8,3 \pm 0,54	20	
		TOTAL	51,6 \pm 2,21	24,9 \pm 1,62	60 \pm 1,96	31,0 \pm 1,25	23,4 \pm 1,06	66,9 \pm 1,01	35,7 \pm 1,03	50,0 \pm 0,88	2,58 \pm 0,07	8,3 \pm 0,28	57	

Anexo 4. Valores promedios \pm SEM de las subcategorías de integridad simultánea y total de membranas plasmática y acrosomal en muestras frescas y criopreservadas con los tres protocolos y por reproductor

SEMEN	PROTOCOLO	REPROD.	IPIA (%)	IPDA (%)	DPIA (%)	DPDA (%)	IMP (%)	IMA (%)	n	
FRESCO	PCC-1	NEGRO	84,0 \pm 3,80	0,67 \pm 0,33	14,0 \pm 3,47	1,33 \pm 0,99	84,7 \pm 3,76	98,0 \pm 1,29	6	
		PADRE	78,4 \pm 4,68	0,62 \pm 0,45	21,5 \pm 5,13	0,33 \pm 0,33	79,0 \pm 4,90	100 \pm 1,11	6	
		HIJO	89,1 \pm 0,88	0,33 \pm 0,21	10,8 \pm 2,18	1,20 \pm 0,49	89,5 \pm 0,82	100 \pm 1,89	6	
	PC2R-2	NEGRO	75,2 \pm 4,45	0,95 \pm 0,95	23,2 \pm 4,44	0	76,2 \pm 4,52	98,0 \pm 1,05	6	
		PADRE	78,8 \pm 4,18	0	19,5 \pm 3,69	1,53 \pm 0,96	78,8 \pm 4,18	98,0 \pm 0,96	6	
		HIJO	85,9 \pm 2,81	0	17,0 \pm 1,83	1,13 \pm 0,70	85,9 \pm 2,81	99,04,28	6	
	PCBP-3	NEGRO	83,9 \pm 3,90	0,83 \pm 0,54	13,8 \pm 2,94	1,50 \pm 1,31	84,7 \pm 3,74	98 \pm 1,67	6	
		PADRE	81,8 \pm 4,15	0,50 \pm 0,50	16,0 \pm 2,97	1,67 \pm 1,31	82,3 \pm 3,76	98 \pm 1,80	6	
		HIJO	85,1 \pm 2,23	0	16,3 \pm 2,38	0,25 \pm 0,25	85,1 \pm 2,23	100 \pm 1,73	6	
	TOTAL, FRESCO			82,5 \pm 3,5	0,4 \pm 0,5	16,9 \pm 3,2	1,0 \pm 0,8	82,9 \pm 3,4	99,4 \pm 1,8	54
	CRIOPRESERVADO	PCC-1	NEGRO	47,8 \pm 1,41	5,1 \pm 0,42	40,1 \pm 1,36	7,06 \pm 0,60	52,8 \pm 1,30	88 \pm 0,92	18
			PADRE	53,0 \pm 2,64	4,2 \pm 0,49	37,2 \pm 2,63	5,62 \pm 0,66	57,2 \pm 2,58	90 \pm 1,03	21
HIJO			57,3 \pm 1,79	3,6 \pm 0,32	33,3 \pm 1,82	5,79 \pm 0,43	61,0 \pm 1,77	91 \pm 0,63	24	
TOTAL			53,1 \pm 1,26	4,2 \pm 0,24	36,5 \pm 1,22	6,10 \pm 0,44	57,4 \pm 1,21	89,7 \pm 0,51	63	
PC2R-2		NEGRO	56,4 \pm 2,09	2,9 \pm 0,39	37,2 \pm 2,08	3,44 \pm 0,28	59,3 \pm 1,97	94 \pm 0,49	18	
		PADRE	52,4 \pm 1,23	2,7 \pm 0,33	41,3 \pm 1,14	3,60 \pm 0,38	55,1 \pm 1,08	94 \pm 0,57	15	
		HIJO	59,0 \pm 1,53	3,4 \pm 0,35	33,4 \pm 1,41	4,21 \pm 0,26	62,4 \pm 1,47	92 \pm 0,47	19	
		TOTAL	56,2 \pm 1,03	3,0 \pm 0,21	37,0 \pm 1,03	3,77 \pm 0,18	59,2 \pm 0,99	93,2 \pm 0,30	52	
PCBP-3		NEGRO	53,1 \pm 1,88	2,5 \pm 0,33	41,2 \pm 1,72	3,26 \pm 0,17	55,6 \pm 1,67	94 \pm 0,37	19	
		PADRE	54,3 \pm 1,21	2,5 \pm 0,24	39,9 \pm 1,05	3,35 \pm 0,34	56,8 \pm 1,05	94 \pm 0,49	23	
		HIJO	61,4 \pm 1,36	2,1 \pm 0,25	33,9 \pm 1,56	2,63 \pm 0,34	63,5 \pm 1,34	95 \pm 0,37	16	
		TOTAL	55,8 \pm 0,97	2,4 \pm 0,16	38,6 \pm 0,90	3,12 \pm 0,18	58,2 \pm 0,88	94,5 \pm 0,26	58	

UCUENCA

Anexo 5. Recolección de semen con vagina artificial (VA)



Sujeción de la yegua



Colecta de muestra seminal con VA

Anexo 6. Dilución, almacenamiento y transporte de muestra seminal



Frasco con muestra colectada

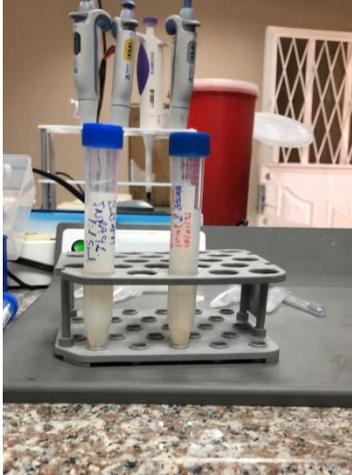


Pre-dilución 1:1



Almacenamiento y transporte

Anexo 7. Procesamiento en laboratorio



Diluciones en fresco para análisis



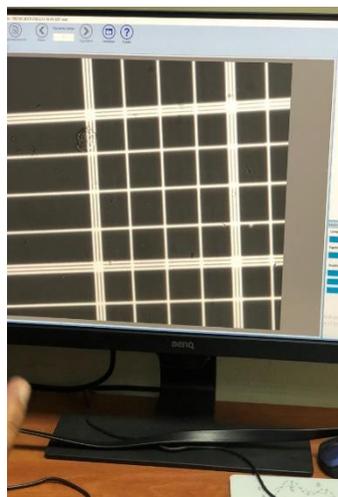
Análisis en sistema CASA



Diluciones con DMF

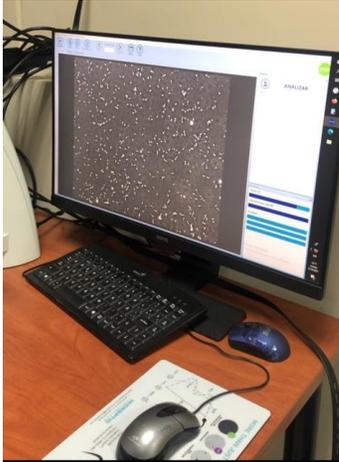


Muestras en cámara de Neubauer



Evaluación de concentración espermática

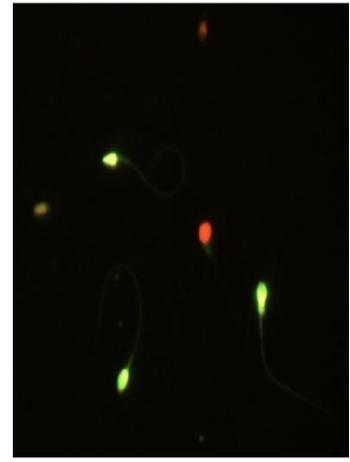
Anexo 8. Evaluación en sistema CASA y fluorescencia



Evaluación en sistema
CASA



Evaluación de
muestras con



Evaluación de
Fluorescencia
(integridad de

Anexo 9. Métodos de Crio preservación



Empajuelado

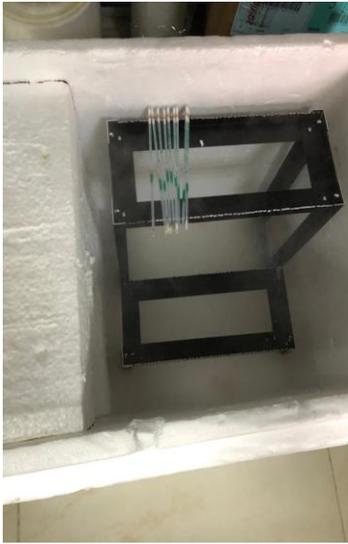


Pajuelas en rampas



Pajuelas en Unidad de
Congelación de 1

UCUENCA



Pajuelas en criobox con 2 rampas



Pajuelas en Biocongelador TK-

Anexo 10. Detección de calor latente y punto de fusión



Biocongelador TK-4000



Unidad congeladora Minitube