

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Influencia de la selección espermática y el método de criopreservación sobre la criosupervivencia de espermatozoides epididimarios bovinos

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

Autoras:

Kelly Estefanía Delgado Arcentales

Angie Celine Morocho Idrovo

Director:

Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2023-06-30

Resumen

Los protocolos de criopreservación de espermatozoides epididimarios bovinos permiten conservar el germoplasma de animales valiosos postmortem. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la selección espermática y el método de congelación sobre la calidad de los espermatozoides epididimarios bovinos posterior a la criopreservación. Se utilizaron quince pools (2 epidídimos por pool) para recuperar muestras espermáticas mediante lavado retrógrado, que se dividieron en dos alícuotas para criopreservarlas mediante congelación convencional lenta (CL) y congelación ultrarrápida (CU). La mitad de cada alícuota se sometió a selección antes de la criopreservación, mediante centrifugación por gradientes de densidad (200 μ L de Percoll al 40 y al 80 %). La CL se realizó diluyendo las muestras en medio TCG+EY+GLY (tris, ácido cítrico, glucosa + 6 % yema de huevo + 5% glicerol), mientras que la CU se realizó diluyendo en TCG+YH+Sacarosa (100 mM). Los resultados indicaron que el método de congelación y la selección espermática afectaron ($P<0,05$) la mayoría de los parámetros cinéticos y de integridad de las membranas plasmáticas. La motilidad total y progresiva, la velocidad promedio y la rectilínea aumentaron en muestras seleccionadas post congelación/descongelación tanto en CL como CU ($P<0,05$). Además, la proporción de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal intactas fue significativamente mayor en muestras seleccionadas y criopreservadas con ambos métodos de congelación ($P<0,05$). Ni las dimensiones de la cabeza, ni la integridad del ADN espermático se vieron afectadas en ningún tratamiento ($P>0,05$). Estos resultados muestran que la selección espermática antes de la criopreservación fue efectiva para crioconservar convencionalmente espermatozoides epididimarios bovinos.

Palabras clave: espermatozoides epididimarios, congelación lenta, congelación ultrarrápida, selección espermática, bovino

Abstract

Bovine epididymal sperm cryopreservation protocols allow preserving the germplasm of valuable animals' postmortem. This study aimed to evaluate the sperm selection and freezing method on the quality of bovine epididymal spermatozoa after cryopreservation. Fifteen pools (2 epididymides per pool) were used to recover sperm samples by retrograde washing, which were divided into two aliquots for cryopreservation by conventional slow freezing (SF) and ultra-rapid freezing (UF). Half of each aliquot was subjected to selection prior cryopreservation by density gradient centrifugation (200 μ L of 40% and 80% Percoll). SF was performed by diluting the samples in TCG+EY+GLY medium (tris, citric acid, glucose + 6 % egg yolk + 5 % glycerol), while UF was performed by diluting in TCG+YH+Sucrose (100 mM). The results indicated that the freezing method and sperm selection affected ($P<0.05$) most of the kinetic and plasma membrane integrity parameters. Total and progressive motility, average and rectilinear velocity increased in post-freeze/thaw selected samples in both SF and UF ($P<0.05$). In addition, the proportion of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes was significantly greater in samples selected and cryopreserved with both freezing methods ($P<0.05$). Neither head dimensions nor sperm DNA integrity were affected in either treatment ($P>0.05$). These results show that sperm selection before cryopreservation was effective for conventionally cryopreserved bovine epididymal spermatozoa.

Keywords: epididymal sperm, slow freezing, ultra-rapid freezing, sperm selection, bovine

Índice de contenido

Introducción.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. Pregunta de investigación.....	15
4. Revisión de literatura.....	16
4.1. Anatomía del testículo del toro.....	16
4.2. Espermatozoides epididimarios.....	16
4.2.1. Morfología.....	17
4.2.2. Funcionalidad.....	18
4.2.3. Características microscópicas.....	18
4.2.4. Métodos de colección de los espermatozoides epididimarios.....	20
4.2.5. Diluyentes de semen.....	21
4.3. Métodos de selección espermática.....	22
4.3.1. Migración espermática vertical (swim-up).....	22
4.3.2. Centrifugación en gradientes de densidad.....	22
4.4. Criopreservación de espermatozoides bovinos.....	23
4.4.1. Congelación Convencional.....	24
4.4.2. Congelación ultrarrápida.....	24
4.4.3. Vitriificación.....	25
4.5. Crioprotectores.....	25
4.5.1. Crioprotectores penetrantes.....	26
4.5.2. Crioprotectores no penetrantes.....	26
4.6. Efectos de la criopreservación en los espermatozoides.....	27
4.6.1. Estrés oxidativo.....	28
4.6.2. Estrés térmico.....	28
4.6.3. Estrés osmótico.....	29
4.6.4. Apoptosis.....	29

4.7.	Integridad de la membrana plasmática	30
4.8.	Integridad del ADN	30
4.8.1.	Naranja de acridina	31
5.	Materiales y Métodos	33
5.1.	Materiales.....	33
5.2.	Área de estudio	35
5.3.	Diseño experimental.....	35
5.3.1.	Obtención de testículos	36
5.3.2.	Colección y evaluación de las muestras espermáticas.....	36
5.3.3.	Dilución de las muestras y tratamientos	37
5.3.4.	Selección espermática	37
5.3.5.	Protocolos de criopreservación	38
5.3.6.	Análisis de calidad espermática	39
5.4.	Análisis estadístico.....	40
6.	RESULTADOS	42
7.	DISCUSIÓN	48
	Conclusiones.....	53
	Referencias	54
	Anexos	66

Índice de figuras

Figura 1 Ubicación de la granja “Irquis” de la Universidad de Cuenca.....	35
Figura 2 Efecto de la selección espermática después de la criopreservación y del método de congelación sobre la integridad de la cromatina en espermatozoides epididimarios bovinos post-congelación (n=20 por grupo experimental) ($P>0,05$). (Media \pm E.E.).....	46
Figura 3 Promedio general del porcentaje de recuperación espermática.....	47

Índice de tablas

Tabla 1 Recursos Materiales	33
Tabla 2 Tratamientos a ser evaluados de acuerdo a la aplicación o no de selección espermática y al método de criopreservación.....	36
Tabla 3 Composición del diluyente TCG.....	36
Tabla 4 Diluyentes de Congelación Lenta y Congelación Ultrarrápida.....	39
Tabla 5 Efecto de la selección espermática y los medios de congelación lenta y congelación ultrarrápida antes de la criopreservación sobre las variables cinéticas en muestras diluidas-frescas de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.)	42
Tabla 6 Efecto de la selección espermática y del método de congelación y sobre las variables cinéticas en muestras post – criopreservación de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.).	43
Tabla 7 Efecto de la selección espermática y del método de congelación sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal en muestras post-criopreservación de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.).....	44
Tabla 8 Efecto de la selección espermática después de la criopreservación y del método de congelación y sobre la morfometría de espermatozoides epididimarios bovinos post-congelación (Media \pm E.E.).....	45

Agradecimientos

Le agradezco principalmente a Dios por brindarme vida y fuerzas para poder sobrellevar todos los problemas del día a día; asimismo, por darme esperanza para poder cumplir con mis sueños y mis metas. Agradezco a mi mamá Jaqueline Arcentales, mi grande luchadora que, aun teniendo un carácter fuerte ha sabido demostrar el amor que tiene hacia mí, mis hermanos y su nieta, me ha ayudado en todo cuánto ha podido; además, de ser uno de los pilares fundamentales de mi vida. A mis hermanos, que con sus locuras y empatía han sabido animarme en tiempos difíciles, demostrando su gran cariño y afecto hacia mí. A mi hija, por llegar en el momento menos esperado pero que más necesitaba, por darme fuerzas para poder continuar; además, de haberme demostrado de lo capaz que puedo llegar a ser. A todas mis mascotas, por ser una gran ayuda para poder mantener mi estabilidad emocional y para enfrentar situaciones de estrés con el simple hecho de estar presentes. A mi amiga y compañera de Tesis Angie Morocho por tenerme paciencia y ayudarme en todo cuánto pudo, por ser comprensiva y empática. A mi familia, amigos, enamorado y cuñado que me han sabido apoyar y ayudar en tiempos difíciles y de quiebre. Además, quiero agradecer a una persona en especial y a la cuál extraño mucho, a mi primo Carlitos, gracias por socorrerme en todo cuánto podías, por animarme y darme esperanzas, por creer en mí y no dudar, te extraño mucho y te agradezco tanto. Sin olvidar a todos los involucrados en el desarrollo del presente trabajo. Al Doctor Fernando Perea por su paciencia, tiempo y entrega, en el que nos ha apoyado de manera incondicional; ya que, sin él no hubiéramos podido llevar a cabo nuestro trabajo, a los técnicos docentes del laboratorio, así como al director del laboratorio les extiendo mis más sinceros agradecimientos.

Kelly Estefanía Delgado Arcentales

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo. En primer lugar, agradezco a mi madre, quien ha sido mi principal apoyo en todo momento, y a mi padre, quien estuvo presente durante todo este recorrido y me brindó el amor y la motivación necesarios para superar cada obstáculo en el camino hacia la culminación de este proyecto.

También quiero dar las gracias a mis hermanas y mi enamorado por su constante aliento y apoyo emocional durante este proceso. Además, agradezco especialmente a mis dos gatos, que han sido una fuente inagotable de estabilidad emocional y compañía durante las largas horas de estudio.

Por último, quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis tutores de la universidad, quienes nos brindaron su orientación, conocimiento y paciencia, lo que me permitió crecer académicamente y mejorar en cada etapa de este proyecto.

Debo destacar que, sin la ayuda y el apoyo de todas estas personas y mascotas, este trabajo no hubiera sido posible. Les estaré eternamente agradecida por haber sido parte de este importante logro.

Angie Celine Morocho Idrovo

Dedicatorias

La presente tesis está dedicada a mi mamá, a quien le hubiera encantado estar presente en la culminación de este trabajo, misma que debido a una enfermedad de carácter grave no puede estarlo por completo. Este trabajo se lo dedico a ella, a mis hermanos y a mi hija; espero poder mejorar nuestras circunstancias actuales y poder brindarles un futuro mejor, uno en el que se sientan seguros y no existan tantas limitaciones. Pero, sobre todo, se lo dedico a mi amiga Angie Morocho y a mí; ya que, este trabajo es fruto de todo nuestro esfuerzo y trayectoria en la Universidad, en donde hemos tenido altibajos, aventuras y un gran proceso de aprendizaje tanto en lo personal como en lo profesional. También se lo dedico a mi querido primo Carlitos, que en paz descansa, que siempre destacó por su alma bondadosa y noble; además, por ayudarme a lo largo de este proceso y que sé, que hubiera estado tan orgulloso de mí como yo lo estaba de él.

Este logro se los dedico con mucho cariño, amor y gratitud. Gracias por festejar mis logros y apoyarme incondicionalmente.

Kelly Estefanía Delgado Arcentales

Quiero dedicar este logro a las personas más importantes en mi vida: mi querida madre y mi padre, quienes siempre me han brindado su amor, apoyo y motivación en todo momento. Por haber estado a mi lado durante todo este proceso y por haberme alentado a perseguir mis sueños, una mención especial a mi MADRE, por ser mi pilar en los momentos más difíciles y por ser la primera en celebrar mis logros.

También quiero dedicar este logro a mis queridos gatos, quienes han sido una fuente infinita de compañía, alegría y amor. Por estar siempre a mi lado y por ser mis confidentes en los momentos de estrés.

Les agradezco por ser una parte fundamental de mi vida y por hacerla más feliz y llena de amor. Este logro es para ustedes, con todo mi amor y gratitud.

Angie Celine Morocho Idrovo

Introducción

La criopreservación de semen permite el almacenamiento de espermatozoides para su uso futuro en programas de mejoramiento genético y para la conservación de germoplasma de especies en riesgo de extinción (Holt, 2000). En bovinos, por muchas décadas se ha usado la congelación convencional o también conocida como congelación lenta, en este protocolo los espermatozoides sufren un proceso de enfriamiento en un lapso de 2 a 4 horas. Llevándose a cabo en 3 pasos, primero las muestras de semen se diluyen en una solución de elementos químicos y energéticos útiles para la supervivencia espermática, luego son expuestos a un crioprotector permeable de bajo peso molecular y consecuentemente ya empajueladas son sumergidos en vapores de nitrógeno líquido, presentándose en la mayoría de casos resultados satisfactorios. Sin embargo, con este método, entre el 40 al 50% de los espermatozoides no sobreviven a la criopreservación (Holt, 2000), y los que sobreviven, tienen menor probabilidad de fertilizar ovocitos, debido a alteraciones de la membrana plasmática y acrosomal; además de, alteraciones en la integridad de la cromatina, alteraciones morfológicas y osmóticas (Watson, 2000). En los últimos años, la congelación ultrarrápida y la vitrificación cinética ha ganado importancia en la criopreservación de espermatozoides de algunas especies de animales domésticos (Arraztoa et al., 2017); (Consuegra et al., 2019), de silvestres (O'Brien et al., 2019), y de humanos (Mohamed, 2015), debido a que aparentemente causa menos daño en la membrana plasmática e integridad funcional de los espermatozoides (Mohamed, 2015). La congelación ultrarrápida es un método de criopreservación mediante el cual los líquidos extracelulares pasan a un estado vítreo sin formación de cristales de hielo intracelular letales para la célula, constituyéndose en un procedimiento alternativo a la congelación convencional (Lv et al., 2019); implicando al uso de concentraciones elevadas de crioprotectores no penetrantes, cuya mezcla en la solución de vitrificación no se cristaliza al enfriarse, en cambio se torna viscosa y se convierte en una estructura sólida, similar al vidrio (Lv et al., 2019).

La congelación ultrarrápida tiene como ventajas ser un método simple, rápido, barato, que no requiere equipos costosos ni gran entrenamiento técnico para aplicarse. Además, no necesita usar protocolos de congelación complejos ni crioprotectores penetrantes (Nawroth et al., 2002). Sin embargo, el éxito de su aplicación, en términos de proporción de espermatozoides estructuralmente íntegros y funcionales luego del calentamiento, depende del tamaño de la cabeza del espermatozoide (Kipper et al., 2016) y de la especie (O'Brien et al., 2019). En los rumiantes, debido al mayor tamaño de la cabeza espermática, en comparación con otras especies la vitrificación no ha sido tan exitosa, debido a que se presentó una correlación negativa, a mayor tamaño de cabeza menor crioestabilidad (Isachenko et al., 2011). El uso

de la sacarosa como crioprotector no penetrante fue probado con éxito en carneros (Arando et al., 2017). En ese estudio se determinó que la sacarosa presenta un alto potencial como agente crioprotector y su almacenamiento a 5°C por 5 minutos en una concentración de 0,4 M está relacionado con una mejor calidad espermática post vitrificación. Asimismo, espermatozoides epididimarios de cabra montés ibérica (*Capra pyrenaica*) fueron exitosamente vitrificados (Pradieé et al., 2018).

Otro estudio realizado por Bóveda et al. (2018) en cabras montés demostró que, pese a su sensibilidad espermática a altas concentraciones de crioprotectores penetrantes y de sacarosa, la combinación de enfriamiento ultrarrápida con (TCG) yema de huevo + sacarosa (100 mM) y rápido calentamiento a 60°C, seguido de selección de espermatozoides por centrifugación en gradiente de densidad para recolectar los espermatozoides móviles, tuvo un efecto positivo en la viabilidad de los espermatozoides.

La selección espermática es una técnica que permite la separación de los espermatozoides del plasma celular, de detritos celulares y de células inmóviles o muertas, que individual o en conjunto pueden perjudicar la viabilidad espermática (Galarza et al., 2018). Aunque existen varios métodos para purificar espermatozoides, la centrifugación por gradientes de densidad ha sido ampliamente usada debido a su eficacia (Galarza et al., 2018; Galarza et al., 2019). Este método de selección espermática, tanto de espermatozoides frescos como criopreservados, demostró su efectividad mejorando la motilidad, las características cinéticas y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides (Galarza et al., 2018).

No hay estudios publicados que hayan reportado con éxito a la congelación ultrarrápida de espermatozoides epididimarios bovinos previamente seleccionados mediante gradientes de densidad. El éxito de este método de criopreservación y de la selección espermática en los bovinos podría tener gran impacto en la conservación de espermatozoides bovinos. Además de ser usados en la inseminación artificial, los espermatozoides epididimarios seleccionados previa criopreservación, podrían usarse en la industria de la producción *in vitro* de embriones, ya que en esta especie es donde esta actividad está más desarrollada y extendida a nivel mundial. También ha sido usado como modelo para la criopreservación de especies silvestres, de bóvidos silvestres.

En este estudio se utilizó como diluyente base el TCG (Tris, ácido cítrico y glucosa) y 100 mM de sacarosa o 5% de glicerol para la congelación ultrarrápida y congelación convencional o lenta respectivamente. Además de someter algunas muestras a la selección espermática y otras no. Se demostró que la congelación ultrarrápida fue tan efectiva como la congelación

convencional o lenta, representando una alternativa prometedora y útil al método convencional de criopreservación, que resultó en espermatozoides de buena calidad después del calentamiento; y que, aquellas muestras que fueron sometidas a selección espermática presentaron mejores resultados que las que no fueron sometidas a selección espermática independientemente del método de criopreservación utilizado.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la selección espermática y el método de criopreservación sobre la calidad y morfometría de espermatozoides epididimarios bovinos.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de selección espermática mediante gradientes de densidad previo a la criopreservación y de dos métodos de criopreservación, convencional y ultrarrápida, sobre la cinética espermática y la morfometría de espermatozoides epididimarios bovinos.
- Evaluar el efecto de selección espermática mediante gradientes de densidad previo a la criopreservación y de dos métodos de criopreservación, convencional y ultrarrápida, sobre la integridad de membranas y fragmentación de la cromatina de espermatozoides epididimarios bovinos.

3. Pregunta de investigación

P1. La centrifugación mediante gradientes de densidad previo a la congelación ultrarrápida permite obtener espermatozoides epididimarios bovinos con calidad y morfometría comparable a los obtenidos mediante la congelación convencional.

4. Revisión de literatura

A través de este apartado, se busca identificar las investigaciones previas relevantes, analizar y sintetizar la información disponible, y establecer las bases teóricas y conceptuales que servirán de marco teórico para el estudio. En el caso de esta tesis, se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura para explorar el tema de *Influencia de la selección espermática y el método de criopreservación sobre la criosupervivencia de espermatozoides epididimarios bovinos*. El objetivo de esta revisión fue examinar las investigaciones previas en este campo, identificar las tendencias y enfoques predominantes e identificar las teorías y conceptos fundamentales que subyacen a este tema.

4.1. Anatomía del testículo del toro

El testículo del toro está compuesto de diferentes estructuras que desempeñan funciones específicas. Según la investigación de Silva et al. (2016), el testículo se divide en tres partes: el cuerpo, el epidídimo y el cordón espermático. El cuerpo del testículo se encuentra rodeado por una capa de tejido conectivo conocido como túnica albugínea. Según lo señalado por Van Soom et al. (2016), la túnica albugínea es una capa fibrosa que se encuentra en la parte exterior del testículo y que protege su contenido interno. Esta capa contiene vasos sanguíneos y nervios que suministran nutrientes y oxígeno al tejido testicular.

Por otra parte, el epidídimo es una estructura que se encuentra en la parte superior del testículo, y tiene la función de almacenar y madurar los espermatozoides. Según la investigación de Durairajanayagam et al. (2015), el epidídimo está formado por un solo conducto enrollado en forma de espiral, que se extiende desde la parte superior del testículo hasta el conducto deferente. El cordón espermático es una estructura que une el testículo con el cuerpo del toro. Para Ciereszko y Dusza (2016), el cordón espermático contiene los conductos deferentes, las arterias y venas testiculares, los nervios y los músculos que controlan la contracción y el movimiento del testículo. Cada una de estas partes tiene una función específica en la producción y almacenamiento de espermatozoides en el toro.

4.2. Espermatozoides epididimarios

Los espermatozoides epididimarios son células reproductivas masculinas maduras que se desarrollan en los testículos y se almacenan y maduran en el epidídimo. El epidídimo es responsable de la maduración de los espermatozoides y les proporciona el ambiente adecuado para que adquieran la capacidad de fertilizar un óvulo (Chłopik & Wysokińska, 2020). Cunha et al. (2019) menciona, que el epidídimo tiene principalmente la función de

llevar a cabo la maduración progresiva y la capacidad fertilizadora de los espermatozoides, las cuales ocurren en la cabeza, el cuerpo y la cola de la estructura.

Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad para ser utilizados en fertilización. Poco tiempo después de la muerte del bovino, estos espermatozoides podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial. Según Oliva et al. (2017), se han llevado a cabo investigaciones que demuestran que los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de animales muertos han demostrado ser viables. En el caso del ganado bovino, se ha utilizado el semen obtenido del epidídimo para la producción de embriones in vitro con una alta tasa de éxito en la fertilización, la utilización de espermatozoides epididimarios, es considerado una herramienta importante y de gran éxito ya que dependiendo de factores como la motilidad espermática los espermatozoides extraídos del epidídimo incluso muchas horas después, mantienen su función normal y pueden ser criopreservados para ser utilizados en fertilización in vitro (Albers y Barrios, 2006).

Los espermatozoides epididimarios se caracterizan por su forma alargada y delgada, con una cabeza, un cuerpo y una cola que les permite moverse y desplazarse hacia el óvulo durante la fertilización. La estructura de los espermatozoides epididimarios está diseñada para maximizar su capacidad de fertilización y su viabilidad en el tracto reproductivo femenino. La importancia de los espermatozoides epididimarios en la reproducción masculina ha sido objeto de estudio en la literatura científica durante muchos años. Según un estudio de revisión publicado por Zhao et al. (2020), “los espermatozoides epididimarios tienen una serie de propiedades biológicas y bioquímicas que los hacen únicos y esenciales para la fertilización”. Entre estas propiedades se incluyen la capacidad de movimiento y la capacidad de unión al óvulo, así como la presencia de enzimas y proteínas que les permiten atravesar la barrera del moco cervical y penetrar en el óvulo.

4.2.1. Morfología

Según un estudio realizado por González-Márquez et al. (2016), los espermatozoides epididimarios bovinos tienen una cabeza ovalada que mide $9 \times 4,5 \times 1 \mu\text{m}$. La cabeza está cubierta por una estructura proteica llamada acrosoma, que contiene enzimas que ayudan al espermatozoide a penetrar la zona pelúcida del óvulo. La cola del espermatozoide es larga y delgada, y está formada por tres partes: la pieza principal, el cuello y la pieza terminal. En otro estudio realizado por Da Costa e Silva et al. (2018), se evaluó la influencia de la edad del toro en la morfología y funcionalidad de los espermatozoides epididimarios. Los resultados indicaron que los espermatozoides de toros más jóvenes presentaron una mayor proporción

de espermatozoides con una morfología normal y una mayor capacidad de fecundación in vitro en comparación con los espermatozoides de toros más viejos.

4.2.2. Funcionalidad

Además de la morfología, la funcionalidad de los espermatozoides epididimarios también es importante para la fertilidad. Un estudio realizado por Domínguez-Rebolledo et al. (2016), evaluó la capacidad de los espermatozoides epididimarios bovinos para soportar la criopreservación y encontró que la supervivencia de los espermatozoides disminuyó significativamente después de la descongelación; sin embargo, los espermatozoides epididimarios presentaron una mayor capacidad de fecundación in vitro en comparación con los espermatozoides obtenidos de la eyaculación, lo que sugiere que los espermatozoides epididimarios podrían ser una alternativa viable para la reproducción asistida. Los espermatozoides epididimarios bovinos tienen una morfología característica que influye en su capacidad para fecundar el óvulo. Estudios recientes han evaluado la influencia de factores como la edad del toro en la morfología y funcionalidad de los espermatozoides epididimarios bovinos, lo que puede ser relevante para mejorar la eficiencia reproductiva en la industria ganadera.

4.2.3. Características microscópicas

a. Concentración

Se conoce como el número de espermatozoides contenidos en un milímetro cúbico de eyaculado. Se han desarrollado varios métodos para determinar la concentración de espermatozoides en una muestra de semen. Algunos de estos métodos incluyen la cámara de recuento celular de Neubauer y la espectrofotometría. Ambos métodos son precisos para el conteo espermático, aunque el fotocolorímetro es más rápido, pero también más costoso que la cámara de Neubauer (Saray, 2021).

Esta cámara es un portaobjetos de vidrio grueso con dos cuadrículas situadas a un lado y otro, estas presentan líneas que ayudan en el conteo y morfología celular, la cual consiste en la diferenciación de los espermatozoides normales de los anormales. Saabedra (2018), explica que la concentración espermática está dada por el número de espermatozoides por mililitros de eyaculado y esta varía en función de la especie, edad, raza, estado fisiológico, método y frecuencia de recolección, también influyen el estado nutricional, la excitación sexual, época del año y peso vivo del animal.

b. Motilidad

De acuerdo con Zambrano y Moreira (2022), señalan que la motilidad es un factor clave para evaluar la capacidad fecundante del espermatozoide, ya que es necesaria para asegurar que el transporte de los espermatozoides hacia el ovocito sea exitoso. En este sentido, la evaluación de la motilidad representa una característica de fundamental importancia en el momento de la penetración del óvulo, junto a la velocidad y al tipo de trayectoria de los espermatozoides se realiza el análisis y se determina la calidad del semen. La motilidad se puede evaluar subjetivamente y objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis. Bernardi et al. (2011), señalan que los avances en electrónica y computación de los últimos años han permitido que la evaluación del semen pueda realizarse de manera más sistemática y objetiva mediante el uso de un analizador seminal computarizado. La motilidad masal es la más utilizada y a su vez la más simple valoración visual, la cual refleja el movimiento de las células espermáticas en conjunto, esta valoración se realiza de forma subjetiva tanto el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y la calidad de los movimientos.

Así, finalmente se puede determinar que un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación. En este mismo orden de ideas Viquez (2020) asegura que, el movimiento activo de los espermatozoides es esencial para la colonización del oviducto durante la fase de transporte en el tracto genital de la hembra, y para que ocurra la fecundación. Así que, para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito debe presentar un valor aceptable de movilidad.

c. Vitalidad

Núñez y Rubio (2015), afirman que la evaluación de la vitalidad espermática permite identificar aquellos espermatozoides con membrana plasmática intacta, lo cual es un factor importante en la evaluación de la calidad del semen y una posible fertilización exitosa. En este sentido, el test de vitalidad espermática permite la identificación de los espermatozoides vivos en una muestra de semen. Existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva entre espermatozoides vivos y muertos, esto como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte del espermatozoide.

La tinción con eosina es una de las metodologías mayormente utilizadas para la valoración de vitalidad, las técnicas de tinción permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes; por tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del

colorante, mientras que si esta alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida. De igual forma Andrade y Palma (2020), explican que para determinar la viabilidad de una muestra de semen se utiliza un tinte vital, en el cual las cabezas de los espermatozoides muertos aparecerán rosadas, mientras que los espermatozoides vivos permanecerán sin teñir. Esto debido a que cuando hay daño en la membrana celular, o si el espermatozoide está muerto, puede atravesarlo y teñirlo mientras que los espermatozoides observados sin tinción, son espermatozoides que tienen membranas celulares intactas y son impermeables al colorante. Por lo tanto, es importante realizar la evaluación de la vitalidad espermática en diferentes campos de la muestra a un conteo de espermatozoides realizando dos lecturas.

Algo muy cierto es que la selección espermática puede mejorar la calidad de los espermatozoides y aumentar la probabilidad de que se produzca una fertilización exitosa; además, el método de criopreservación utilizado para preservar los espermatozoides también puede tener un impacto en su viabilidad y capacidad para fertilizar un óvulo. Por lo tanto, la evaluación de características microscópicas como la concentración, motilidad y vitalidad de los espermatozoides antes y después del proceso de selección espermática y criopreservación puede ser importante para comprender cómo estos procesos afectan la calidad y viabilidad de los espermatozoides y, por lo tanto, su capacidad para producir una fertilización exitosa.

4.2.4. Métodos de colección de los espermatozoides epididimarios

Los toros que son seleccionados para realizar la colección y congelamiento de semen deben pasar por un examen clínico completo, ya que estas pruebas son un requisito indispensable para dicha selección. A través de estas pruebas se pueden detectar posibles enfermedades contagiosas o anomalías que impedirían que la fertilización y preñez sean exitosas. Pero, no en todos los casos pueden llevarse estos exámenes a cabo, como es en el caso de los toros de matadero mismos que en nuestra región suelen ser enviados por presencia de algún problema de salud o anomalías reproductivas. La colección de espermatozoides en este caso suele llevarse a cabo a partir de la disección del epidídimo y la extracción de los espermatozoides de la cola del mismo. Existen varios métodos para la colección de semen bovino a partir de la cola del epidídimo, entre las cuales tenemos la técnica de slicing o de corte y la técnica de flushing o de flujo retrógrado. A continuación, vamos a describir la técnica utilizada en el presente estudio de investigación.

a. Técnica de Flushing

Esta técnica es conocida también como la técnica por lavado con flujo retrógrado, se realiza posterior a la disección del epidídimo, luego se coloca una jeringa en el conducto deferente, se secciona el epidídimo en la unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo. A continuación, se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con un diluyente adecuado, al verse que se comienza a abultar se realiza un corte para la obtención de la masa espermática. Se debe considerar que en la cabeza del epidídimo se da la eliminación de los fluidos que sobran del espermatozoide inmaduro, en el cuerpo los espermatozoides empiezan a tener su capacidad fecundante; mientras que, en la cola se da fundamentalmente el almacenamiento de espermatozoides maduros (Cuaran y Burbano, 2014).

Aquellos espermatozoides que son obtenidos por esta técnica pueden presentar cierto porcentaje de inmadurez, y caracterizarse por presenciar un gran número de gotas citoplasmáticas y baja motilidad. Al ser realizada la recolección postmortem, el estado de los espermatozoides suele ser poco eficiente, ya que los mismos, son sensibles a las bajas cantidades de oxígeno, a la acción de fármacos y a la endotoxemia; por ello, se recomienda que la recolección de semen postmortem proveniente de animales que han estado enfermos y han precisado de tratamiento farmacológico no se lleve a cabo puesto que dan malos resultados (Cuaran y Burbano, 2014).

4.2.5. Diluyentes de semen

Se entiende por diluyente seminal, a la solución acuosa que permite incrementar el volumen del eyaculado hasta obtener una concentración de espermatozoides adecuada, y un número de dosis determinada; además, tiene como propósito preservar las características funcionales de los espermatozoides y conservar una capacidad fecundante adecuada (Moncayo, 2016). Según Farroñan (2021), durante décadas se han venido estudiando diversas soluciones para diluir el semen, principalmente el de bovinos, los cuales solo permitían conservar espermatozoides viables por uno a cuatro días a temperaturas cercanas a los 4 °C; luego, después de los años 50 se descubrió las propiedades conservantes de la yema de huevo, la cual presentaba la ventaja de disminuir el metabolismo de la célula espermática y prolongar su fertilidad a 5 °C.

Al respecto Cruz (2015), menciona que los diluyentes de semen poseen como función principal proteger la integridad de la membrana plasmática de las células reproductoras, constituyendo un componente fundamental para la criopreservación, prolongando la sobrevivencia y motilidad de los espermatozoides, y por lo tanto la capacidad fecundante luego de la descongelación; cabe destacar que, la efectividad de los diluyentes depende de algunos compuestos básicos que los asemejan al plasma seminal. Los diluyentes de semen

deben poseer una fuente de energía, un elemento amortiguador que sea capaz de mantener el balance de pH, una fuente de lipoproteínas para prevenir el choque térmico, entre otros componentes que garantizan su efectividad.

Según Cruz (2015), los diluyentes deben ser isotónicos, deben tener capacidad amortiguadora, deben proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico y proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides. Además de esto, deben controlar el crecimiento microbiano y preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad (Carpio, 2015).

4.3. Métodos de selección espermática

La selección espermática es un proceso que ocurre normalmente a lo largo del tracto reproductivo de la hembra, luego que miles de millones de espermatozoides son depositados durante la eyaculación, pero pocos miles llegan al sitio de fecundación (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2016). Este mecanismo garantiza que solo los espermatozoides funcionalmente mejor dotados alcancen el sitio donde ocurre la fertilización. Existen varias técnicas con las cuales se pueden seleccionar en el laboratorio, espermatozoides eyaculados o recuperados de la cola del epidídimo. Estos se basan en 1) la migración espermática (basado en la motilidad espermática), 2) en la filtración a través de diversos materiales (fibras de vidrio, perlas de Sephadex, poros de membrana), pero también basada en la motilidad espermática, y 3) en la centrifugación a través de un coloide (basada en la motilidad, morfología y viabilidad espermática, e integridad de la cromatina) (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2016). A continuación, se expondrá los principales métodos de selección espermática.

4.3.1. Migración espermática vertical (swim-up)

Jara y Paredes (2021), explican que este método se emplea frecuentemente para la selección de espermatozoides móviles del eyaculado; es decir, la migración separa la fracción móvil de la fracción inmóvil. Para llevar a cabo este procedimiento se coloca una muestra en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, después de un tiempo, los espermatozoides motiles se desplazan hacia la superficie del tubo, permitiendo así la separación de espermatozoides con morfología normal y alta motilidad.

4.3.2. Centrifugación en gradientes de densidad

Benítez et al. (2018) explican que, la centrifugación en gradientes de densidad es una técnica que se utiliza para separar células mediante la sedimentación y retención diferencial en un medio de densidad variable. Las células con superficies equivalentes sedimentan en las

zonas que tienen densidades similares, de esta forma los gradientes actúan como un filtro para los espermatozoides sin movilidad progresiva o que presentan una cabeza con niveles de condensación de la cromatina bajos o bien leucocitos o células epiteliales que pudieran estar presentes en el eyaculado, los espermatozoides con mejor nivel de compactación de la cromatina en su cabeza, se depositan en el fondo del coloide y se seleccionan positivamente.

4.4. Criopreservación de espermatozoides bovinos

Ribeiro et al. (2014), afirman que la técnica de criopreservación de semen es una tecnología fundamental en la reproducción, que tiene como objetivo preservar el material genético de machos de alto valor por un período de tiempo indefinido. Esta biotecnología asociada a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. Según Núñez y Rubio (2015), para la criopreservación del semen bovino se inicia con la extracción del semen a través de métodos como la vagina artificial, masaje transrectal o electroeyaculador; posteriormente, se evalúa la calidad del semen obtenido y se determina el número de dosis y su respectiva dilución. Una vez realizada esta etapa, se procede a la adición del diluyente o crioprotector.

Según Moncayo (2016), la criopreservación de semen constituye una ventaja económica para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de animales valiosos, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexuales en el rebaño. Desde la perspectiva de Cruz (2015), otra de las razones por las cuales la criopreservación del semen es beneficiosa para los productores es cuando un toro muere inesperadamente, y a través de esta biotecnología se puede preservar su material genético mediante la colecta de espermatozoides del epidídimo. Este es un procedimiento postmortem que se considera una importante herramienta para la recuperación de espermatozoides, que luego de recolectados de la cola del epidídimo, pueden ser criopreservados o utilizados de inmediato en la fecundación in vitro o en la inyección intracitoplasmática en los ovocitos.

Mejía (2017), comenta que la criopreservación comprende cinco etapas: la dilución y la suma del crioprotector, el envasado y enfriamiento, la congelación, el almacenamiento y la descongelación o calentamiento, dependiendo del método, lo que hace que haya una relación entre la función de la membrana y el metabolismo pudiendo que el espermatozoide detenga su función en cada etapa.

Los espermatozoides se procesan y se mezclan con una solución crioprotectora que protege las células del daño causado por el frío (Watson, 2000). A continuación, los espermatozoides se enfrían lentamente y se almacenan en nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Muñoz, 2019). Esta técnica de criopreservación del semen se emplea extensamente para

preservar los recursos genéticos animales y aprovechar los sementales con características genéticas superiores mediante la inseminación artificial. La criopreservación de espermatozoides bovinos ha permitido la distribución a nivel mundial de material genético de toros de élite, mejorando así la eficiencia en la producción de carne y leche (Watson, 2000). Durante el proceso de criopreservación, el esperma de mamíferos experimenta cambios bruscos de temperatura, desde la temperatura ambiente hasta la del refrigerador (fase suprazero) y posteriormente durante la ultracongelación (fase bajo cero) (Anzar et al., 2019).

4.4.1. Congelación Convencional

La congelación convencional es conocida también como congelación lenta, en este protocolo los espermatozoides sufren un proceso progresivo de enfriamiento en el lapso de 2 a 4 horas. Este protocolo se lleva a cabo en 3 pasos, ya sea manualmente o automáticamente. Las muestras de semen se diluyen en una solución que provee los elementos químicos y energéticos necesarios para la supervivencia espermática, y luego se exponen a un crioprotector permeable de bajo peso molecular, que deshidrata las células y protege al espermatozoide contra los efectos nocivos de la congelación (por ejemplo, la formación de cristales). Durante la congelación se favorece la formación de cristales de hielo debido a los electrolitos y agua que suelen quedar dentro de ellas, y acusan el mayor daño físico-químico a los espermatozoides (Villamil y Lombana, 2021). En este protocolo, la velocidad de enfriamiento es controlado favoreciendo así la acción del crioprotector que se aplicará para disminuir los daños osmóticos (Gadea, 2003). Si la velocidad en que la célula se enfría es lo suficientemente lento la misma va a perder agua a una velocidad suficientemente rápida por exosmosis, así los solutos se concentran a tal manera que se elimine el sobre-enfriamiento intracelular y así mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular (Grötter et al., 2019).

4.4.2. Congelación ultrarrápida

Consiste en el enfriamiento ultrarrápido, a una velocidad de entre 2000 a 100000 °C/min dependiendo del volumen a ser criopreservado, con un crioprotector no penetrante, como la sacarosa. Estos crioprotectores no penetrantes causan la deshidratación de la célula incrementando la osmolaridad del líquido extracelular, reduciendo así la posibilidad de que se formen cristales en el interior del espermatozoide (O'Brien et al., 2019). Es un método rápido y sencillo ya que requiere muy poco tiempo comparado con el método convencional, o congelación lenta. Además, se menciona que el coste de los equipos es bajo y el procedimiento a aplicar es sencillo (Restreto Betancur et al., 2009). Este método presenta 3 componentes que influyen en el proceso de congelación: volumen, velocidad de enfriamiento

y viscosidad, a menor volumen y mayor velocidad de enfriamiento y viscosidad, se obtiene mejores resultados de criopreservación (Viera, 2018). Con esta técnica se formará hielo externo, manteniendo el contenido de la célula descongelado y sobre-enfriado, esto puede deberse a que la membrana plasmática bloquea la formación de cristales en el citoplasma. Se presenta un potencial químico diferente entre el agua interior de las células y el agua exterior, esta diferencia hace que el agua salga de la célula y se congele externamente (Mazur, 1984).

4.4.3. Vitrificación

Proaño (2013), explica que la técnica de vitrificación implica exponer el material biológico al nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C , con el objetivo de alcanzar un estado vídrio que preserva las orientaciones moleculares del estado líquido, evitando la formación de hielo dentro y fuera de la célula. Como se mencionó anteriormente, la vitrificación es un proceso de congelación ultrarrápida en una mezcla de crioprotectores no penetrantes en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo. Previo al proceso de vitrificación se debe realizar el proceso de crioprotección a través de las distintas soluciones para evitar la formación de cristales de hielo, luego se procede a sumergirlo directamente en el nitrógeno líquido a -196°C .

4.5. Crioprotectores

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución (Gómez, 2019). En concordancia con lo anterior, el semen bovino sufre diversas formas de lesiones celulares durante el proceso de congelación al cual es sometido, estas lesiones son provocadas por la formación de hielo intracelular; por tal razón, la composición del crioprotector de semen podría ayudar a reducir este daño, estas sustancias actúan favoreciendo la excreción de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación intracelular de cristales de hielo.

Para O'Brien et al. (2019), la crioconservación de espermatozoides bovinos es una técnica ampliamente utilizada para la conservación de esta célula reproductiva y su utilización en programas de inseminación artificial. La calidad del semen después de la descongelación depende de la eficacia del crioprotector utilizado durante el proceso de crioconservación. Los crioprotectores son sustancias químicas que protegen a las células contra los daños causados por la congelación y descongelación. Se han utilizado diferentes tipos de crioprotectores en la crioconservación de espermatozoides bovinos, entre los cuales se incluyen glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol; entre otros.

Un estudio reciente realizado por Smith et al. (2020), evaluó el efecto de diferentes concentraciones de glicerol y DMSO en la calidad del semen después de la criopreservación. Los resultados mostraron que una concentración del 7,5% de glicerol y 7,5% de DMSO proporcionó una mejor viabilidad y motilidad espermática después de la descongelación. Por otro lado, un estudio realizado por López-Uruena et al. (2021), evaluó el efecto de la adición de ácido alfa-lipoico (ALA) como agente antioxidante en la criopreservación de espermatozoides bovinos. Los resultados indicaron que la adición de ALA a la solución crioprotectora mejoró la calidad del semen después de la descongelación, en términos de motilidad y viabilidad espermática.

4.5.1. Crioprotectores penetrantes

Crioprotectores penetrantes como: glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, formamida, 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol y propilenglicol, tienen un peso molecular bajo que permite que entren en las células debido a la diferencia de concentración; para que puedan afectar el espermatozoide durante la criopreservación al cambiar las propiedades físicas de la solución intracelular, regulando la estructura de proteínas y lípidos de la membrana celular, así como aumentando fluidez de la membrana (Whaley et al., 2021).

Según Luzon (2015), entre los crioprotectores utilizados en la criopreservación de espermatozoides bovinos, se encuentran los penetrantes, que son sustancias capaces de penetrar en las células y protegerlas del daño celular; los crioprotectores penetrantes más utilizados son el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. El DMSO ha sido utilizado como crioprotector en la criopreservación de espermatozoides bovinos debido a su capacidad para proteger las células del daño generado durante la congelación; además, ha demostrado ser eficaz en la prevención de la formación de cristales de hielo, los cuales podrían dañar las células.

Por otro lado, el glicerol también ha sido utilizado como crioprotector en la criopreservación de espermatozoides bovinos debido a su capacidad para penetrar en las células y protegerlas del daño celular (Saabedra, 2018). Además, ha demostrado ser eficaz en la prevención de la formación de cristales de hielo y en la disminución del estrés osmótico generado durante la descongelación.

4.5.2. Crioprotectores no penetrantes

Según Cueva y Moya (2015), los crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociadas

a los agentes penetrantes. Criopreservar espermatozoides bovinos es una técnica muy común en la industria ganadera, se han desarrollado diversas técnicas de congelación y vitrificación para conservar el material genético de alta calidad. La utilización de crioprotectores es esencial para el éxito de estas técnicas (Cueva & Moya, 2015).

Según Behnamifar et al. (2021) se han investigado los crioprotectores no penetrantes, como la trehalosa y otros azúcares, que pueden evitar la toxicidad y el daño celular durante la congelación. Las investigaciones más recientes sobre criopreservación de espermatozoides bovinos sugieren que la utilización de crioprotectores no penetrantes mejora la calidad del semen después de la descongelación. Un estudio realizado por Torres et al. (2019), comparó el efecto de la trehalosa con el glicerol como crioprotector en la congelación de semen bovino. Los resultados mostraron que el uso de trehalosa mejoró significativamente la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación.

Otro estudio realizado por Ratto et al. (2018), en donde se investigó el efecto de los azúcares como crioprotectores no penetrantes concluyeron que, los espermatozoides congelados con azúcares tuvieron una mejor calidad que los congelados con glicerol. Se puede decir entonces que la utilización de crioprotectores no penetrantes puede mejorar la calidad del semen después de la descongelación en comparación con los penetrantes.

4.6. Efectos de la criopreservación en los espermatozoides

“El uso de crioprotectores reduce los efectos perjudiciales de la congelación y descongelación sobre los espermatozoides, ya que los protege del choque térmico, el estrés osmótico y las alteraciones en la fluidez y la permeabilidad de la membrana” (Pérez et al., 2021, p.2). Por otro lado Calle (2020), señala que la criopreservación del semen bovino puede ocasionar daños irreversibles en las membranas de los espermatozoides, tales como la expansión y alteración de las membranas plasmáticas y del acrosoma, cambios en el medio osmótico, alteración del mecanismo de calcio y cambios en la actividad enzimática. En este mismo sentido, la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la posterior unión de los espermatozoides al ovocito, requieren de una actividad de membrana bioquímicamente activa.

Al respecto Elgueta (2018) comenta que, la calidad del semen congelado-descongelado depende de la capacidad de los espermatozoides de resistir estos procedimientos sin perder sus funciones principales. Es preciso aclarar que durante los procesos de criopreservación se producen daños letales y subletales en los espermatozoides similares a la apoptosis que afectan a la viabilidad e integridad de los espermatozoides y por lo tanto a su vida media y capacidad fecundante. Para Elgueta (2018), los daños sufridos durante la criopreservación

seminal han sido clasificados por varios autores según su origen en daños a los cambios de temperatura, de osmolaridad o a la acción de agentes oxidantes.

4.6.1. Estrés oxidativo

Pérez (2020) explica que, la membrana de los espermatozoides de los rumiantes tiene una baja proporción de colesterol y fosfolípidos en comparación con otras especies, lo que hace que sean más propensos a la peroxidación lipídica y, por lo tanto, a sufrir estrés oxidativo durante el almacenamiento a largo plazo en condiciones aeróbicas. Debido a la susceptibilidad a la peroxidación de fosfolípidos, se producen radicales libres denominados especies reactivas de oxígeno (ROS) de forma desequilibrada, que afectan la capacidad de fertilización. La producción de ROS se da tanto por el proceso de criopreservación como también por la baja reserva de antioxidantes que puedan neutralizar estos radicales libres, lo que no permite tolerar las tensiones oxidativas que se formaron durante la criopreservación.

Las especies reactivas de oxígeno dañan la fluidez de la membrana, la integridad de la cromatina y la cinética del espermatozoide. Por lo tanto, el estrés oxidativo se considera como un estado de desequilibrio que se origina en el cuerpo y la excesiva producción de ROS derriba las defensas antioxidantes, donde se desencadenan alteraciones como las deformidades espermáticas al obstaculizarse la espermatogénesis, deterioro de la funcionalidad del espermatozoide y finalmente la infertilidad (Valverde, 2016).

En términos de estructura, se ha demostrado que el estrés oxidativo puede provocar daño en el ADN de las células y afectar la integridad de la membrana plasmática (Durairajanayagam et al., 2015). El estrés oxidativo puede también disminuir la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides, lo que afecta directamente la tasa de fertilización y el éxito reproductivo (Grötter et al., 2019).

4.6.2. Estrés térmico

La congelación y descongelación de los espermatozoides provoca un choque térmico, mismo que reduce el porcentaje de espermatozoides móviles y su producción de energía; además, hay un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, una alteración de la permeabilidad selectiva de las membranas de los espermatozoides reduce la motilidad de los espermatozoides, disminuye la producción de energía, cambia la composición de los lípidos de la membrana y afecta los comportamientos dinámicos de la membrana (Papa et al., 2015).

4.6.3. Estrés osmótico

Al no existir una correcta velocidad de congelación durante el protocolo de criopreservación, el estrés osmótico de los espermatozoides aumenta. Este efecto negativo de la criopreservación se da por el enfriamiento por debajo del punto de congelación, cuando los cristales de hielo se nuclean y el agua se cristaliza. A su vez, los solutos permanecen disueltos en la fracción no congelada y por ende la presión osmótica aumenta (Stornelli et al., 2005). El estrés osmótico puede producir variaciones en las membranas y en los microtúbulos de los espermatozoides; además, de ocasionar daños morfológicos en la cabeza de los mismos (O'Brien et al., 2019).

4.6.4. Apoptosis

Según Alanis (2020), asegura que la apoptosis es un proceso natural que regula la estabilidad de los tejidos, la respuesta inmune y el desarrollo embrionario, el cual se distingue por cambios celulares como la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la creación de cuerpos apoptóticos. Durante eventos tempranos de la apoptosis, en la membrana celular ocurre la traslocación de la fosfatidilserina, de la parte citoplasmática hacia la parte externa, esta actúa como señal para que la célula apoptótica sea reconocida por los macrófagos y eliminada por los fagocitos, por lo que no provoca respuesta inflamatoria. Por otra parte, se ha descrito que la criopreservación del semen bovino induce fenómenos característicos de la apoptosis, como son la disminución del potencial de membrana mitocondrial, la activación de las caspasas y el aumento de la permeabilidad de la membrana, los cuales estarían implicadas en la disminución de la movilidad celular.

Desde la perspectiva de Saravia et al. (2017), la apoptosis es un proceso de muerte celular programada que puede ocurrir en espermatozoides durante la criopreservación, este proceso es regulado por varios factores y puede tener efectos negativos en la calidad espermática.

En este sentido Zhao et al. (2020), aseguran que la apoptosis se puede evaluar mediante técnicas como la detección de la actividad de las caspasas, la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis y la observación de cambios morfológicos en los espermatozoides. Además, se ha observado que la criopreservación reduce la integridad de la membrana plasmática y del acrosoma en los espermatozoides bovinos, lo que también indica la presencia de apoptosis (Tvrdá et al., 2018). Estos cambios pueden afectar la capacidad de los espermatozoides para fecundar el óvulo y, por lo tanto, reducir la fertilidad.

4.7. Integridad de la membrana plasmática

Cabrera y Pantoja (2012) comentan que, la integridad de la membrana plasmática refleja la viabilidad espermática y el proceso de criopreservación podría afectarla ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de la misma, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad. Esto quiere decir que, la integridad de la membrana plasmática es un parámetro crucial para evaluar la calidad espermática. Durante la criopreservación, los espermatozoides experimentan cambios que afectan su estructura y función. La integridad de la membrana plasmática se puede medir mediante el uso de sondas fluorescentes, como la YO-PRO-1 y el yoduro de propidio. La YO-PRO-1 se une a los espermatozoides con membranas intactas, mientras que el yoduro de propidio se une a los espermatozoides con membranas dañadas (Johnson et al., 2019).

Existen estudios que han evaluado la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides bovinos después de la criopreservación. Por ejemplo, un estudio encontró que la vitrificación de espermatozoides bovinos resultó en una mayor integridad de la membrana plasmática en comparación con la congelación lenta (Zhao et al., 2020). Es importante tener en cuenta que la integridad de la membrana plasmática no siempre se correlaciona con la capacidad de fecundación de los espermatozoides después de la criopreservación; por lo tanto, se deben utilizar múltiples parámetros de evaluación de la calidad espermática para determinar la viabilidad de los espermatozoides después de la criopreservación.

4.8. Integridad del ADN

De acuerdo con Machorro et al. (2018), la integridad del ADN espermático es un parámetro ideal para evaluar la calidad seminal y un predictor del potencial de fertilidad. Se ha demostrado a través de estudios en espermatozoides bovinos que uno de los cambios observados más importantes en el proceso de criopreservación es el daño del ADN espermático, incluso existen evidencias que el daño del ADN espermático tiene una correlación positiva con mayores niveles de ROS. Al respecto Zambrano y Moreira (2022), comentan que:

La criopreservación de espermatozoides es una técnica comúnmente utilizada en la industria ganadera para preservar la genética de los animales. Sin embargo, durante este proceso se pueden producir daños en el ADN de los espermatozoides debido a la exposición a temperaturas extremas y a sustancias crioprotectoras.

Desde el enfoque de (Nag et al., 2021), la integridad del ADN espermático es un factor crucial para la fertilidad y el éxito reproductivo. La evaluación de la integridad del ADN se puede realizar mediante técnicas como el ensayo de fragmentación del ADN espermático (SDF) y la tinción con Hoechst (Cueva Hurtado, 2018). Varios estudios han demostrado que la criopreservación de espermatozoides bovinos puede tener efectos negativos en la integridad del ADN. Por ejemplo, se ha observado un aumento en el daño del ADN espermático después de la congelación lenta en comparación con la ultrarrápida. Además, se ha encontrado que la adición de ciertos crioprotectores puede aumentar el daño del ADN espermático (García, 2016; Zambrano y Moreira, 2022).

En relación a lo anteriormente expresado, la integridad del ADN espermático también puede verse afectada por factores ambientales como el estrés térmico. Se ha demostrado que el estrés térmico puede provocar daño en el ADN espermático (Sabés-Alsina et al., 2019). Además, puede afectarse también por estrés oxidativo, mismo que puede provocar fragmentación del ADN (Bollwein & Bittner, 2018). Lo que en términos generales significa que la integridad del ADN espermático es un parámetro importante a tener en cuenta al evaluar la calidad de los espermatozoides post-criopreservación y por esta razón, es necesario seguir investigando en esta área para mejorar las técnicas de criopreservación y garantizar la calidad y la fertilidad de los espermatozoides bovinos criopreservados.

4.8.1. Naranja de acridina

Moreno y Murillo (2001), definen a la naranja de Acridina como una tinción cuyo colorante es un fluorocromo que se une en forma diferencial al ADN y ARN, de manera que constituye un auxiliar excelente para evidenciar la presencia de microorganismos. La naranja de acridina se trata de un colorante especialmente útil para la detección rápida por microscopía de fluorescencia, de microorganismos en muestras normalmente estériles como sangre y LCR; donde pueden encontrarse escasos gérmenes o para aquellos extendidos con abundante material proteico, a efectos de establecer un buen contraste con la coloración de fondo lo cual facilita la diferenciación (Muñoz, 2019).

El procedimiento de evaluación por citometría de flujo de la cromatina espermática (SCSA), utiliza el fluorocromo metacromático naranja de acridina, y evalúa la susceptibilidad a la desnaturalización de la cromatina de los espermatozoides tratados. Al respecto Domínguez (2021), explica que la naranja de acridina es una tinción capaz de intercalarse en los ácidos nucleicos que presenta propiedades metacromáticas, de manera que dependiendo de a lo que esté unido y de las condiciones de pH en las que se encuentre, es capaz de emitir luz en diferentes longitudes de onda. Así, cuando se une al ADN de doble cadena emite

fluorescencia verde, mientras que cuando entra en compartimentos ácidos como el lisosoma, debido a los niveles de pH tan bajos, emite luz naranja.

Según Liu et al. (2021), la técnica de naranja de acridina se basa en la unión del colorante a la cromatina del núcleo del espermatozoide. Los espermatozoides vivos presentan una membrana celular intacta y una carga de ADN nuclear normal, lo que les permite excluir la naranja de acridina; por otro lado, los espermatozoides muertos presentan una alteración en la membrana celular que permite la entrada de la sustancia, el cual se une a la cromatina, generando una fluorescencia roja.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

En la investigación se utilizaron diferentes materiales, entre ellos biológicos, reactivos, equipos, instrumentos y materiales desechables que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

Recursos Materiales

Biológicos	Reactivos	Equipos	Instrumentos	Material Fungible
- 30 testículos de 15 toros faenados en camal	<ul style="list-style-type: none"> - TCG: (Tris, ácido cítrico y glucosa) - Yema de Huevo - Percoll - Yoduro de propidio - Isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de maní - SpermBlue - Fijador de Carnoy - Metanol 	<ul style="list-style-type: none"> - Baño María - 1 balanza analítica - 1 microscopio - HOST test - Equipo CASA - Rampa de calentamiento 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 platina térmica - 1 cámara de Neubauer - Pipetas graduables - 1 termómetro para pajuelas - Pinzas de disección 	<ul style="list-style-type: none"> - Guantes de nitrilo - Mascarillas - Papel secante - Jeringas (1 ml y 10ml) - 1 paquete de 500 pajuelas de 0,25 ml - Puntas de pipetas descartables - 9 cajas de cubreobjetos - 6 cajas de portaobjetos - Tubos Falcon - Tubos eppendorfs

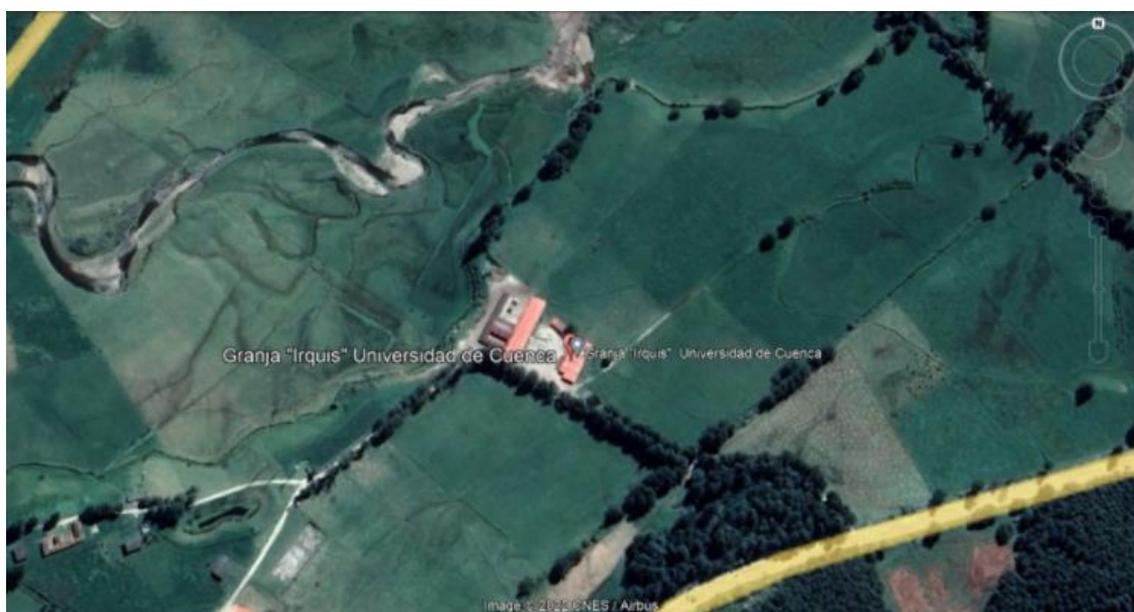
	- Naranja de Acridina			
--	--------------------------	--	--	--

5.2. Área de estudio

El estudio tuvo lugar en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, que se encuentra ubicado en la parroquia Victoria del Portete, a 22 km de la ciudad de Cuenca. La granja mencionada está ubicada a una altitud de 2700 msnm en las siguientes coordenadas X:714648 m y Y:9656762 m; área en la que predomina una precipitación media anual de 789 mm y una temperatura anual que oscila entre los 10 a 15°C.

Figura 1

Ubicación de la granja "Irquis" de la Universidad de Cuenca



5.3. Diseño experimental

Se aplicó un diseño factorial de 2 X 2, que incluyó el método de criopreservación (congelación convencional lenta y congelación ultrarrápida) y la selección espermática (espermatozoides sin seleccionar y seleccionados en gradientes de densidad de Percoll). En el estudio se utilizaron 15 pools de espermatozoides epididimarios bovinos asignados al azar de 30 testículos de toro recuperados *post mortem* (2 testículos/pool). Cada muestra agrupada fue dividida en dos grandes alícuotas, una para ser criopreservada mediante congelación lenta (CL) y la otra mediante congelación ultrarrápida (CU). Cada alícuota fue diluida en TCG (tris, ácido cítrico y glucosa) y yema de huevo (YH; 6%, v/v). La mitad de cada alícuota fue seleccionada mediante centrifugación de gradientes de densidad a 300 x g por 20 minutos (200 µL de Percoll al 40% y al 80%) antes de la criopreservación, y el pellet fue resuspendido en el mismo medio TCG+YH con el respectivo crioprotector (5% de glicerol en CL y 100 mM

de sacarosa en CU), mientras que las muestras de la otra mitad fueron directamente criopreservadas. De acuerdo a la combinación de los dos factores de estudio (método de congelación y selección espermática), en la Tabla 2 se muestran los tratamientos que fueron sujetos a evaluación. Se evaluaron en total 90 pajuelas, 6 pajuelas por pool y 30 criotubos, es decir 2 criotubos por pool con pellets de 0,5 μm .

Tabla 2

Tratamientos a ser evaluados de acuerdo a la aplicación o no de selección espermática y al método de criopreservación

Selección / No selección espermática	Congelación convencional	Congelación ultrarrápida
Sin selección	T1 → Sin selección	T3 → Sin Selección
Con Selección	T2 → Con Selección	T4 → Con Selección

5.3.1. Obtención de testículos

Los testículos fueron recolectados aleatoriamente de bovinos faenados en el camal municipal de Cuenca (EMURPLAG), aparentemente sanos, adultos y sexualmente maduros. Fueron transportados al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la granja de Irquis en recipientes aislantes (enfriador), en un lapso de 2 a 3 horas a temperatura ambiente.

5.3.2. Colección y evaluación de las muestras espermáticas

Los epidídimos fueron removidos de los testículos y los espermatozoides fueron recuperados por flujo retrógrado (Cuaran y Burbano, 2014), administrando 1 ml de TCG y 6% de yema de huevo (Tabla 3). Cada muestra fue colectada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y sometida a una evaluación para determinar la motilidad, con el objetivo de determinar si la muestra era apta o no para continuar con la dilución y el respectivo protocolo de criopreservación. Se calculó el volumen de cada pool y la concentración espermática mediante el uso del espectrofotómetro.

Tabla 3

Composición del diluyente TCG

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g

Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomicina	300 mg
Agua milli Q	300 ml

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg

5.3.3. Dilución de las muestras y tratamientos

Antes de la conformación de los cuatro tratamientos, las muestras epididimarias de cada uno de los Pools, se evaluaron la concentración y la motilidad. Luego, para el tratamiento T1: Congelación convencional sin selección, la muestra fue diluida en diluyente TCG + 6% YH, a una concentración final de 100 millones espermatozoides/ ml; asimismo, para el tratamiento T3: Congelación ultrarrápida sin selección, la concentración final se ajustó a 50 millones espermatozoides/ml.

El volumen total restante de cada pool se dividió en dos partes iguales y fue asignado a los tratamientos cuyas muestras posteriormente fueron seleccionadas (T2: Congelación convencional con selección y T4: Congelación ultrarrápida con selección). A continuación, el contenido de cada una de estas muestras espermáticas epididimarias se colocó en un volumen de 200 µl sobre cada uno de los tubos que contenían los gradientes de densidad de Percoll, hasta agotar todo el volumen asignado para dicho tratamiento, tal como se indica a continuación.

5.3.4. Selección espermática

Para este procedimiento, se preparó en varios tubos Eppendorf de 1,5 ml, dos gradientes de 200 µl de diferente densidad de Percoll a concentraciones de 40% y 80% respectivamente, diluida en Bovipure TM (Nicadon). Finalmente, se agregó sobre el gradiente de Percoll del 40%, un volumen de 200 µl de solución espermática epididimaria a temperatura ambiente. Inmediatamente, los tubos fueron centrifugados a 300 × g durante 20 minutos y luego de ello, el pellet remanente de cada uno de los tubos preparados, para la selección de cada uno de los tratamientos fue resuspendido en un único volumen final de 1ml de solución TCG + 6% de yema de huevo, para su posterior congelación.

Asimismo, los tratamientos que fueron sometidos a selección, nuevamente se evaluó la concentración espermática. Posteriormente, los datos fueron tabulados en Excel y se aplicó las fórmulas de porcentaje por tratamiento con selección espermática por pool, posteriormente se calculó el promedio general del porcentaje de recuperación espermática tanto para el

Tratamiento 2 (Congelación Lenta con Selección espermática) como para el Tratamiento 4 (Congelación Ultrarrápida con Selección espermática).

5.3.5. Protocolos de criopreservación

Como métodos de criopreservación se utilizaron la congelación ultrarrápida y la congelación lenta, tal como se describe a continuación. Después de haber criopreservado y almacenado las muestras por al menos 30 días, el proceso se revirtió mediante calentamiento y descongelación respectivamente. Las muestras calentadas y descongeladas fueron sometidas a varios análisis posteriores.

a. Congelación Lenta

Las muestras sin seleccionar y seleccionadas de la primera alícuota se diluyeron en la fracción 1 que está conformada por TCG + 6% de YH, a una concentración de 200×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente la fracción 1 se mezcló con la fracción 2 (TCG + 6% de YH + 5% glicerol) (Tabla 4). Después, la fracción 1 se combinó con la fracción 2, que es una mezcla de TCG, un 6% de YH y un 5% de glicerol (como se muestra en la Tabla 4). Ambas fracciones se mezclaron en proporciones iguales, lo que resultó en una solución final con una concentración de 100×10^6 espermatozoides por mililitro. Las muestras diluidas se colocaron en refrigeración durante 120 minutos a una temperatura de 5°C . Luego, se cargaron en pajuelas de 0,25 ml que previamente habían sido enfriadas a 5°C . La congelación se realizó en vapores de NL_2 , colocando las pajuelas en una rampa a 4 cm sobre la superficie de NL_2 durante 10 minutos, y luego se sumergieron inmediatamente en NL_2 para continuar el proceso de congelación.

b. Congelación Ultrarrápida

Las muestras sin seleccionar y seleccionadas de la segunda alícuota fueron diluidas en la fracción 1, compuesta de TCG + 6% de YH, a una concentración ajustada de 100×10^6 espermatozoides/ml. La primera fracción se mezcló progresivamente con la fracción 2 (Tabla 4), conformada por TCG + 6% de YH + 100 mM de sacarosa, para obtener una solución final con una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras diluidas se refrigeraron por 30 minutos a 5°C . La congelación ultrarrápida se llevó a cabo sumergiendo gotas de aproximadamente 30 μl de la solución de vitrificación en nitrógeno líquido (NL_2), contenido en una caja de poliestireno. Los pellets de muestras se almacenaron en criotubos de 2 ml. El calentamiento se realizó en un dispositivo de calentamiento de elaboración artesanal a una temperatura entre 62 y 65°C .

Tabla 4

Diluyentes de Congelación Lenta y Congelación Ultrarrápida

Reactivo	Cantidad
Fracción 1 para ambos métodos de criopreservación	
TCG	94 ml
Yema de huevo* inactivada a 56°C por 30 min.	6 ml (v/v)
Fracción 2 de congelación lenta	
Fracción 1	95 ml
Glicerol	5 ml (v/v)
Fracción 2 de congelación ultrarrápida	
Fracción 1	100 ml
Sacarosa	100 mM (MW:342,3 g/mol) = 3,423 g

*Centrifugada a 4000 x g por 10 min y eliminado el pellet

5.3.6. Análisis de calidad espermática

Las muestras de espermatozoides epididimarios fueron sujetas a varias evaluaciones antes y después de la criopreservación para determinar sus características y calidad.

a. Cinética espermática

Se llevó a cabo mediante el uso del sistema de análisis espermático computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fase Nikon (Nikon Eclipse 50i; Nikon Instruments Inc., New York, USA). Siguiendo el procedimiento indicado por Galarza et al. (2018), se analizaron las siguientes variables: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

b. Integridad de las membranas espermáticas

Este procedimiento se realizó mediante la exposición de los espermatozoides epididimarios a dos tinciones fluorescentes: yoduro de propidio e isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de maní (*Arachis hypogaea*) (PNA-FITC). Para ello se siguió el procedimiento indicado por Galarza et al. (2018). El estado de las membranas espermáticas se determinó utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL;

Nikon Instruments Inc., New York, USA. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %); y con ambas membranas espermáticas dañadas (DPDA, %).

c. Morfometría espermática

Se midió la longitud, ancho, área, perímetro, elipticidad, elongación, rugosidad y regularidad de la cabeza de los espermatozoides, así como también el ancho, área, ángulo de inserción de la pieza intermedia y el porcentaje de acrosomas normales, usando el módulo de morfometría del sistema CASA. Se realizaron frotis de muestras espermáticas que se tiñeron con SpermBlue (Microptic, Barcelona, España) durante 10 minutos. Los extendidos fueron examinados con un microscopio de contraste fase acoplado al sistema CASA a una magnificación de 40 x.

d. Integridad del ADN

La integridad del ADN equivalente a la estabilidad de la cromatina del núcleo espermático se evaluó según el protocolo indicado por Martins et al. (2007), con algunas modificaciones. Se tomaron 10 μ L de las muestras criopreservadas y se realizaron un frotis en un portaobjetos rotulado. Estos se dejaron secar y se fijaron por al menos 12 horas en una solución fijadora PBS (o solución de Carnoy), y una mezcla de metanol (o ácido acético) en proporción 3:1. Los frotis se secaron al aire y se incubaron en solución de tampón (80 mmol/L de ácido cítrico y 15 mmol/L de Na_2HPO_4 , pH 2,5) a 75 °C durante 5 min para probar la estabilidad de la cromatina. Posteriormente, se tiñeron con el fluorocromo naranja de acridina (0,2 mg/ml). Los frotis se lavaron con agua bidestilada 1 o 2 veces por 2 segundos. Estando aún húmedas, se cubrieron con cubreobjetos y se evaluaron con un microscopio de epifluorescencia (excitación: de 490/530 nm). Se analizaron 100 células en cada portaobjetos de tratamiento. Los espermatozoides con contenido normal de ADN presentaron fluorescencia verde, mientras que los que tengan ADN anormal emitieron fluorescencia en un espectro entre el amarillo verdoso al rojo naranja. El porcentaje de espermatozoides con cromatina intacta se calculó dividiendo el número de espermatozoides teñidos de verde entre el número total de espermatozoides, multiplicado por 100.

5.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS (SAS; Version 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba

Shapiro Wilk. En los casos en los que no se cumplió el principio de normalidad, las variables porcentuales (proporción de espermatozoides con alteración o no de las membranas espermáticas; proporción de espermatozoides con la cromatina íntegra) fueron transformadas al *Arcoseno* y las numéricas (variables cinéticas y de morfometría espermática) al *Logaritmo 10*, cumpliendo así los supuestos de normalidad. Los efectos de la selección espermática y del método de criopreservación y su interacción fueron analizados mediante el análisis de varianza en un arreglo factorial 2 x 2 con el procedimiento modelo lineal general. Las diferencias entre medias fueron analizadas con la prueba de los mínimos cuadrados (LSmean). Los datos fueron expresados en media \pm SEM (error estándar de la media). Las diferencias se consideraron altamente significativas cuando $P < 0.01$ y significativas cuando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

Se observó una interacción significativa entre método de congelación (en este caso efecto del crioprotector en las muestras diluidas-frescas) y la selección espermática únicamente en las variables MP ($P = 0,0335$), WOB ($P = 0,00003$) y ALH ($P = 0,0223$) (Tabla 5). Según los hallazgos, la adición del crioprotector a las muestras que posteriormente fueron criopreservadas mediante congelación lenta o ultrarrápida afectaron la cinética espermática, dado que, en la mayoría de los casos, estas variables fueron significativamente mejores en las muestras diluidas con TCG + 6% de YH + 5% glicerol que en las diluidas en TCG + 6% de YH + 100 mM sacarosa. Con excepción de la MT y MP, y del WOB y ALH, las demás variables cinéticas fueron influenciadas por la selección espermática; es decir, en general, estas características cinéticas fueron mejores en las muestras seleccionadas con Percoll que en las no seleccionadas.

Tabla 5

Efecto de la selección espermática y los medios de congelación lenta y congelación ultrarrápida antes de la criopreservación sobre las variables cinéticas en muestras diluidas-frescas de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.)

Cinética espermática	Método de congelación				Valor P de la Interac.
	Lenta		Ultrarrápida		
	sin selección (n=15)	con selección (n=15)	sin selección (n=15)	con selección (n=15)	
MT (%)	94,5 \pm 2,0 ^{a, c}	93,2 \pm 1,8 ^{a, c}	77,5 \pm 6,3 ^{b, c}	86,0 \pm 4,5 ^c	ns
MP (%)	53,4 \pm 5,4 ^c	51,7 \pm 5,0 ^c	21,6 \pm 3,1 ^d	37,8 \pm 3,7 ^e	*
VCL (μ m/s)	79,6 \pm 4,8 ^{e, g}	83,7 \pm 4,0 ^{e, g}	59,8 \pm 3,2 ^f	75,1 \pm 4,4 ^g	ns
VAP (μ m/s)	40,3 \pm 2,3 ^{a, c}	45,1 \pm 2,3 ^a	32,9 \pm 1,5 ^b	39,4 \pm 2,2 ^c	ns
VSL (μ m/s)	27,5 \pm 2,1 ^{a, d}	32,0 \pm 1,8 ^a	18,1 \pm 0,9 ^b	24,8 \pm 1,6 ^d	ns
STR (%)	65,6 \pm 1,6 ^c	67,8 \pm 1,6 ^c	54,1 \pm 1,0 ^d	59,8 \pm 1,3 ^f	ns
LIN (%)	35,4 \pm 1,2 ^{g, j}	38,7 \pm 1,3 ^h	32,4 \pm 0,6 ^{i, j}	33,6 \pm 1,1 ^j	ns
WOB (%)	52,4 \pm 0,7 ^{j, m}	55,2 \pm 0,9 ^{k, m}	59,2 \pm 1,1 ^l	54,7 \pm 0,9 ^m	**
ALH (μ m)	3,8 \pm 0,2 ^{m, p}	3,6 \pm 0,1 ^{m, p}	3,2 \pm 0,1 ^o	3,6 \pm 0,1 ^p	*
BCF (Hz)	8,2 \pm 0,5 ^p	9,2 \pm 0,3 ^q	4,6 \pm 0,1 ^r	6,7 \pm 0,4 ^s	ns

Interac.: interacción entre el método de congelación y la selección espermática: ns: no significativa; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Letras diferentes entre valores de la misma línea difieren: a-b, f-g, a-b, a-d, c-f, d-f, h-i, h-j, k-l, l-m, p-s, r-s $P < 0,01$; c-d, e-f, j-j, p-r, q-r, p-s $P < 0,0001$; c-e, b-c, a-c, g-h, g-i, j-k, m-o, o-p, p-q $P < 0,05$;

MT: motilidad total; MP: motilidad espermática progresiva; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad de trayectoria media; VSL: velocidad en línea recta; STR: rectitud; LIN: linealidad; WOB: bamboleo; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de cruce de batido.

Luego de congelación y descongelación, se observó efecto de la interacción entre el método de congelación y la selección espermática en las variables MT ($P = 0,0361$), MP ($P = 0,0146$), VAP ($P = 0,0010$), VSL ($P = 0,0052$), ALH ($P = 0,0128$) y BCF ($P = 0,0361$) (Tabla 6). La evaluación de la cinética espermática muestra que el método de congelación afectó la MT, MP, ALH y BCF (Tabla 6). En la mayoría de los casos, las muestras criopreservadas mediante congelación lenta mostraron mejores características cinéticas que las de congelación ultrarrápida, aunque en algunas de ellas las diferencias fueron no significativas. Por otro lado, la selección con Percoll mejoró la cinética de los espermatozoides en las variables MT, MP, VAP, VSL, LIN, WOB y BCF (Tabla 6). En la mayoría de estas variables cinéticas el efecto de la selección espermática fue altamente significativo, y la comparación de medias entre las muestras seleccionadas o no, dentro de un mismo método de congelación, mostraron diferencias altamente significativas solo en las criopreservadas mediante congelación lenta. Es importante notar que la magnitud de la diferencia entre las muestras seleccionadas o no, fue notablemente mayor en las criopreservadas con congelación lenta que con congelación ultrarrápida.

Tabla 6

Efecto de la selección espermática y del método de congelación y sobre las variables cinéticas en muestras post-criopreservación de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.)

Cinética espermática	Método de congelación				Valor P de la Interac.
	Lenta		Ultrarrápida		
	sin selección (n=45)	con selección (n=45)	sin selección (n=45)	con selección (n=45)	
MT (%)	55,1 \pm 4,1 ^a	68,8 \pm 3,2 ^b	23,1 \pm 2,3 ^c	26,0 \pm 2,2 ^d	*
MP (%)	28,2 \pm 3,3 ^a	37,8 \pm 2,8 ^b	9,1 \pm 1,0 ^{c, d}	9,7 \pm 0,8 ^d	*
VCL (μ m/s)	52,1 \pm 1,8 ^d	60,0 \pm 2,0 ^{f, g, h}	59,4 \pm 2,0 ^{g, h}	57,4 \pm 2,0 ^h	**
VAP (μ m/s)	26,6 \pm 0,9 ^d	31,9 \pm 1,2 ^{f, g, h}	30,5 \pm 1,0 ^{g, h}	30,1 \pm 0,8 ^h	**
VSL (μ m/s)	18,3 \pm 0,7 ^d	22,8 \pm 1,0 ^{f, g, h}	21,3 \pm 0,9 ^{g, h}	21,3 \pm 0,8 ^h	**
STR (%)	63,9 \pm 0,5 ^a	65,3 \pm 0,8 ^a	64,2 \pm 0,9 ^a	65,2 \pm 0,9 ^a	ns
LIN (%)	34,9 \pm 0,6 ^{h, i, j}	37,2 \pm 0,9 ^{i, j, k}	36,0 \pm 0,9 ^{j, k}	37,7 \pm 1,2 ^k	ns
WOB (%)	52,2 \pm 0,6 ^{h, i, j}	54,1 \pm 0,8 ^{i, j, k}	53,6 \pm 0,9 ^{j, k}	55,1 \pm 1,0 ^k	ns
ALH (μ m)	2,5 \pm 0,07 ^k	2,7 \pm 0,07 ^{l, n}	2,8 \pm 0,09 ^{m, n}	2,7 \pm 0,08 ⁿ	*
BCF (Hz).	6,2 \pm 0,2 ^{n, p, q}	7,3 \pm 0,2 ^o	5,7 \pm 0,2 ^p	6,1 \pm 0,2 ^q	*

Interac.: interacción entre el método de congelación y la selección espermática: ns: no significativa; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Letras diferentes entre valores de la misma línea difieren: a-b, a-c, a-d, b-c, b-d, n-o, o-p, o-q $P < 0,0001$; c-d, d-h, h-k, k-l $P < 0,05$; d-f, d-g, k-m $P < 0,01$

MT: motilidad total; MP: motilidad espermática progresiva; VCL: velocidad curvilínea; VAP: velocidad de trayectoria media; VSL: velocidad en línea recta; STR: rectitud; LIN: linealidad; WOB: bamboleo; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de cruce de batido.

La evaluación de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios bovinos mostró un efecto de la interacción entre el método de congelación y la selección espermática únicamente en las variables DPDA ($P < 0,0206$) e integridad de la membrana acrosomal ($P < 0,0163$) (Tabla 7). Por otro lado, el método de congelación influyó en la IPIA, IPDA y DPDA, así como también en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, pero no así en la DPIA. Se observa que las muestras criopreservadas mediante congelación lenta mostraron mejores características de integridad de membranas ($>IPIA$ y $<DPDA$) que las de congelación ultrarrápida. La integridad de las membranas plasmática y acrosomal fue proporcionalmente mayor en las muestras criopreservadas mediante congelación lenta que congelación ultrarrápida. Por otro lado, la selección espermática influyó en gran medida en la IPIA, DPDA y en la integridad de las membranas plasmática y acrosomal. En ambos métodos de criopreservación, la selección espermática mejoró la integridad de las membranas.

Tabla 7

Efecto de la selección espermática y del método de congelación sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal en muestras post-criopreservación de espermatozoides epididimarios bovinos (Media \pm E.E.)

Variables de integridad de membrana	Método de congelación				Valor P de la Interac
	Lenta		Ultrarrápida		
	<i>sin selección</i> (n=45)	<i>con selección</i> (n=45)	<i>sin selección</i> (n=45)	<i>con selección</i> (n=45)	
¹ Subpoblac. esp.					
<i>IPIA (%)</i>	52,2 \pm 2,2 ^a	56,8 \pm 1,8 ^b	30,8 \pm 1,4 ^c	40,2 \pm 1,2 ^d	ns
<i>IPDA (%)</i>	1,0 \pm 0,1 ^a	1,1 \pm 0,1 ^a	2,0 \pm 0,5 ^a	1,6 \pm 0,4 ^a	ns
<i>DPIA (%)</i>	16,9 \pm 1,5 ^a	16,0 \pm 1,5 ^a	15,6 \pm 0,8 ^a	15,8 \pm 1,4 ^a	ns
<i>DPDA (%)</i>	29,7 \pm 1,9 ^{a,b}	26,1 \pm 1,5 ^b	51,7 \pm 1,3 ^c	42,0 \pm 1,4 ^d	*
² Integridad Total					
<i>Integridad T de la M. Plasmática (%)</i>	53,3 \pm 2,1 ^a	57,8 \pm 1,7 ^b	32,8 \pm 1,5 ^c	41,9 \pm 1,4 ^d	ns
<i>Integridad T de la M. Acrosomal (%)</i>	69,2 \pm 1,9 ^a	72,9 \pm 1,5 ^b	46,5 \pm 1,3 ^c	56,1 \pm 1,4 ^d	*

¹ Subpoblación de espermatozoides; ² Integridad de membranas espermáticas Interac.: interacción entre el método de congelación y la selección espermática: ns: no significativa; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Letras diferentes entre valores de la misma línea difieren: ^{a-b} $P < 0,05$; ^{a-c, a-d, b-c, b-d, c-d} $P < 0,0001$.

IPIA = porcentaje de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal intactas, IPDA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosomal dañada, DPIA = porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosomal intacta, y DPDA = porcentaje de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal dañadas.

Al realizar la evaluación de la morfometría de los espermatozoides epididimarios bovinos post-congelación se demostró que no hubo interacción entre el método de congelación y la selección espermática en ninguna de las variables estudiadas. No obstante, el método de congelación no influyó en la mayoría de los parámetros evaluados, con excepción del área de la cabeza ($P = 0,0008$), rugosidad ($P = 0,0006$) y regularidad ($P < 0,0001$) de la cabeza, y al ancho ($P = 0,0020$) y área ($P < 0,0001$) de la pieza intermedia (Tabla 8). La selección espermática afectó solo el ancho ($P = 0,0109$) y área ($P = 0,00491$) de la pieza intermedia. Las muestras criopreservadas con congelación lenta fueron significativas solo en las variables rugosidad, regularidad y ancho de la pieza intermedia. No hubo diferencia estadística entre las muestras (seleccionadas o no) en la congelación ultrarrápida en ninguno de los parámetros. Como se observa en la Tabla 8, independientemente de si se practicó o no la selección, los espermatozoides congelados mediante el método lento tuvieron un área de la cabeza y pieza intermedia menor, y un ancho de la pieza intermedia mayor que los criopreservados con congelación ultrarrápida.

Tabla 8

Efecto de la selección espermática después de la criopreservación y del método de congelación y sobre la morfometría de espermatozoides epididimarios bovinos post-congelación (Media \pm E.E.)

Variables de morfometría espermática	Método de congelación			
	Lenta		Ultrarrápida	
	<i>sin selección</i> (n=10)	<i>con selección</i> (n=10)	<i>sin selección</i> (n=10)	<i>con selección</i> (n=10)
Cabeza				
<i>Longitud (μm)</i>	9,2 \pm 0,03 ^a	9,2 \pm 0,05 ^a	9,3 \pm 0,07 ^a	9,3 \pm 0,06 ^a
<i>Ancho (μm)</i>	4,5 \pm 0,02 ^a	4,5 \pm 0,03 ^a	4,6 \pm 0,02 ^a	4,5 \pm 0,04 ^a
<i>Área (μm^2)</i>	38,2 \pm 0,2 ^{a, b}	38,2 \pm 0,5 ^b	39,5 \pm 0,4 ^{c, d}	39,3 \pm 0,4 ^d
<i>Perímetro (μm)</i>	20,2 \pm 0,04 ^a	20,1 \pm 0,11 ^a	20,1 \pm 0,17 ^a	21,0 \pm 0,84 ^a
<i>Elipticidad</i>	2,0 \pm 0,01 ^a	2,1 \pm 0,01 ^a	2,0 \pm 0,02 ^a	2,0 \pm 0,02 ^a
<i>Elongación</i>	0,3 \pm 0,003 ^a	0,3 \pm 0,002 ^a	0,3 \pm 0,004 ^a	0,3 \pm 0,004 ^a
<i>Rugosidad</i>	1,18 \pm 0,005 ^a	1,20 \pm 0,008 ^b	1,21 \pm 0,007 ^{c, d}	1,22 \pm 0,006 ^d
<i>Regularidad</i>	0,86 \pm 0,002 ^d	0,85 \pm 0,002 ^e	0,84 \pm 0,002 ^{f, g}	0,84 \pm 0,002 ^g
Pieza Intermedia				

¹ Ancho (μm)	1,05 \pm 0,02 ^g	1,00 \pm 0,02 ^{h, i}	0,98 \pm 0,02 ^{i, j}	0,95 \pm 0,01 ^j
Área (μm^2)	7,1 \pm 0,1 ^{d, e}	7,7 \pm 0,2 ^e	8,5 \pm 0,2 ^{f, g}	8,9 \pm 0,2 ^g
Ang. Inserc. ($^\circ$)	2,6 \pm 0,04 ^a	2,6 \pm 0,05 ^a	2,6 \pm 0,07 ^a	2,6 \pm 0,04 ^a
Acrosoma (%)	58,1 \pm 0,1 ^a	58,1 \pm 0,1 ^a	58,0 \pm 0,1 ^a	58,1 \pm 0,1 ^a

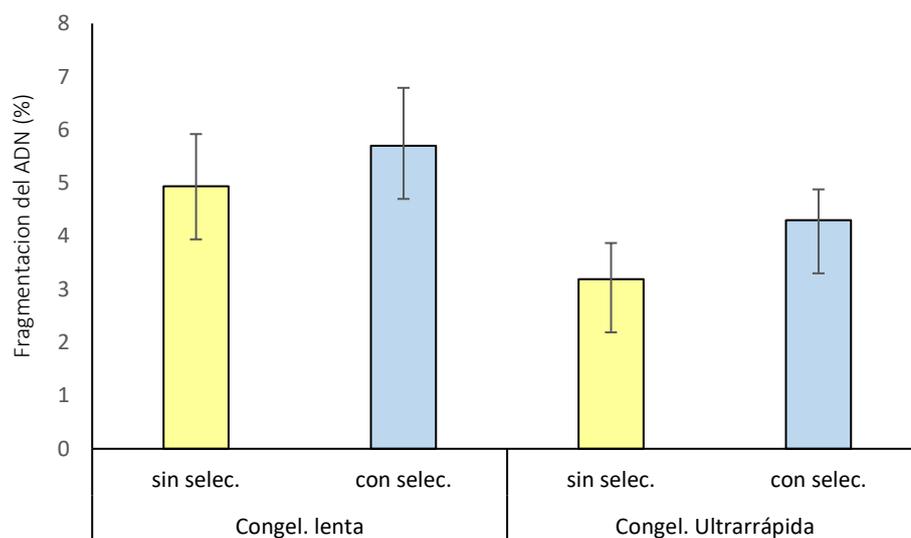
Ang. Inserc.: ángulo de inserción.

Letras diferentes entre valores de la misma línea difieren: a-b, b-c, d-e P < 0,05; a-c, a-d, e-f, e-g, g-j P < 0,01; d-f, d-g, g-h, g-i, h-j P < 0,0001.

Los resultados del estudio demostraron que ni el método de congelación (P = 0,0702) ni la selección espermática (P = 0,3421) ni la interacción entre ambas afectaron la integridad del ADN en espermatozoides epididimarios bovinos luego de la congelación/descongelación (Figura 2).

Figura 2

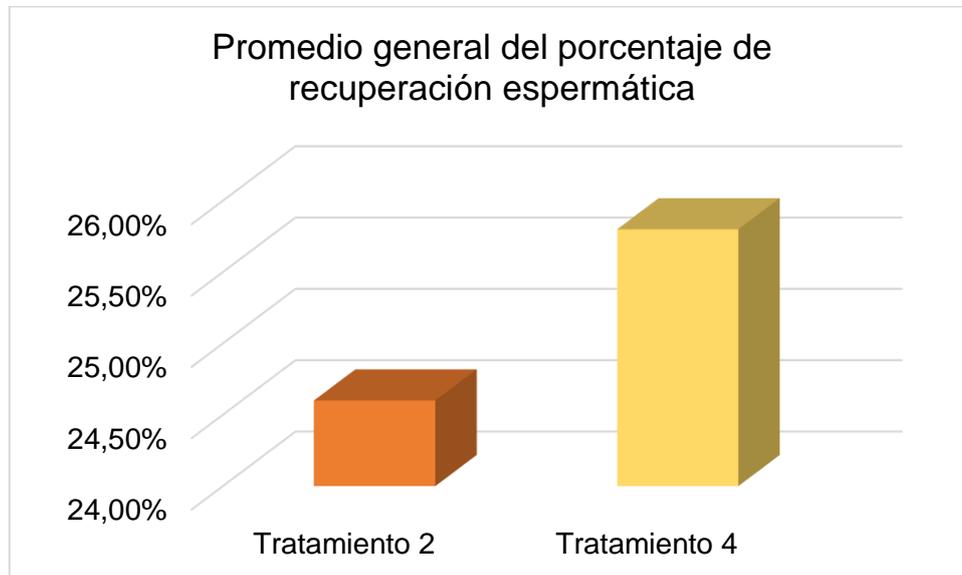
Efecto de la selección espermática después de la criopreservación y del método de congelación sobre la integridad de la cromatina en espermatozoides epididimarios bovinos post-congelación (n=20 por grupo experimental) (P>0,05). (Media \pm E.E.)



Como punto extra, pero de igual importancia en nuestro estudio, los datos de concentración espermática post-selección para el Tratamiento 2 y Tratamiento 4 fueron evaluados; obteniéndose así, un promedio en el porcentaje de recuperación espermática del 24,6% para el Tratamiento 2 (Congelación Lenta con Selección espermática) y del 25,8% para el Tratamiento 4 (Congelación Ultrarrápida con Selección espermática). Siendo mayor el porcentaje de recuperación espermática en el Tratamiento 4 (Figura 3).

Figura 3

Promedio general del porcentaje de recuperación espermática



7. DISCUSIÓN

La criopreservación de espermatozoides es una técnica crucial para preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva en la industria ganadera. No obstante, la calidad cinética de los espermatozoides puede verse afectada por el proceso de criopreservación debido a la formación de cristales de hielo y otros factores asociados con la congelación y descongelación (Grötter et al., 2019). Por tanto, es importante observar que algunos factores como el método de congelación (Bóveda et al., 2018), los crioprotectores utilizados (O'Brien et al., 2019) y la selección espermática (Galarza et al., 2018), pueden afectar múltiples parámetros espermáticos; tales como, la cinética, la integridad de membranas, la morfometría y la integridad de la cromatina (Lv et al., 2019).

Este estudio evidenció que la selección espermática antes de la criopreservación mejoró la calidad espermática y aumentó la supervivencia de los espermatozoides. No obstante, este efecto se vio reflejado diferencialmente en las muestras asignadas a cada método de criopreservación. La selección espermática mejoró notablemente casi todos los parámetros cinéticos en las muestras frescas diluidas que posteriormente serían criopreservadas mediante congelación ultrarrápida, y afectó muy poco a las criopreservadas por congelación lenta. No obstante, luego de la criopreservación, fueron estas últimas las que mejoraron notablemente las variables cinéticas luego de la congelación y descongelación. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de estudios previos que demostraron que la selección espermática mejoró la calidad de los espermatozoides después de la criopreservación (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2016; Galarza et al., 2018).

Además, este estudio mostró que la selección espermática previo a la criopreservación también mejoró significativamente la integridad de las membranas plasmática y acrosomal en espermatozoides epididimarios bovinos. A diferencia de la cinética espermática de las muestras congeladas/descongeladas, cuyos valores fueron considerablemente mayores en las muestras seleccionadas, la integridad de las membranas espermáticas en las muestras seleccionadas y luego criopreservadas mediante congelación ultrarrápida mejoró más que las criopreservadas mediante congelación convencional.

La selección espermática post criopreservación pudo haber mejorado la proporción de espermatozoides con las membranas plasmática y acrosomal intacta mediante la eliminación de espermatozoides muertos o dañados. De hecho, estudios previos han descrito que la selección espermática post criopreservación puede mejorar la calidad del semen en diferentes especies, incluyendo bovinos, cerdos, equinos y ovejas (Zuidema et al., 2021) y caninos (Galarza et al., 2021). Conjuntamente se evidenció que la selección espermática, al ser

usadas junto a protocolos de congelación de semen presentan una mejor viabilidad en comparación con las muestras no seleccionadas (Hoogewijs et al., 2011).

En este estudio, el método de congelación tuvo un impacto significativo en la calidad cinética de los espermatozoides, ya que la congelación lenta mostró mejores resultados en varias variables cinéticas en comparación con la congelación ultrarrápida. Esto coincide con los resultados de la investigación realizada por Bóveda et al. (2020), en cabras montés, donde se pudo observar que la motilidad disminuyó al utilizar congelación ultrarrápida como método de criopreservación. Este resultado es consistente a lo observado en la Tabla 6, que muestra que la congelación ultrarrápida resultó en una disminución significativa de la motilidad total y progresiva en comparación con la congelación lenta. Es importante notar, no obstante, que las velocidades VCL, VAP y VSL no variaron entre ambos métodos de criopreservación, y en los casos en que lo hicieron, fueron mejores en las muestras sin selección sometidas a congelación ultrarrápida. Esto significa que, aunque la congelación ultrarrápida afectó la motilidad y la integridad de las membranas espermáticas, los espermatozoides funcionales exhibieron velocidades espermáticas comparables con las que fueron criopreservadas mediante congelación lenta. Estos resultados son consistentes con estudios previos en caninos que demostraron que la congelación ultrarrápida puede dañar los espermatozoides y reducir su capacidad de movimiento, sin afectar la velocidad con las que se mueven los que están funcionalmente íntegros (Galarza et al., 2021). Es importante destacar que se observó una interacción significativa entre la selección espermática y el método de congelación para varias variables cinéticas, como la MT, MP, VCL, VAP y ALH. Esto indica que los efectos de la selección espermática y el método de congelación no son independientes entre sí e interactuaron de manera compleja para afectar la calidad del esperma después de la criopreservación. Según los resultados de estas interacciones, es claro que la selección espermática y la congelación lenta representaron la mejor opción para criopreservar espermatozoides epididimarios bovinos.

De acuerdo a los resultados de las variables cinéticas en muestras diluidas frescas, la selección espermática afectó significativamente la calidad cinética de los espermatozoides. Específicamente, la selección espermática mejoró varios parámetros cinéticos, lo que sugiere que esta técnica puede ser valiosa para mejorar la calidad de los espermatozoides antes de la criopreservación. Estos resultados son consistentes con otros estudios que han demostrado que la selección espermática puede mejorar la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Morrell et al., 2017), resultados que se presume se lograron por la separación de detritos celulares, espermatozoides muertos o funcionalmente comprometidos, y bacterias del fluido seminal.

Evidentemente, la adición de sacarosa al diluyente afectó la calidad espermática, dado que numerosas variables cinéticas fueron significativamente menores en las muestras diluidas frescas que luego serían criopreservadas mediante congelación ultrarrápida en comparación a las de congelación lenta. En concordancia a los hallazgos de este estudio, la adición de concentraciones crecientes de sacarosa en muestras seminales frescas de carnero antes de la vitrificación (Jiménez-Rabadán et al., 2015) o de la congelación ultrarrápida (Arando et al., 2017) redujo los parámetros cinéticos. Asimismo, en muestras seminales diluidas de bovinos, el incremento en la concentración de sacarosa o trehalosa redujeron la motilidad individual e incrementaron el porcentaje de espermatozoides muertos (Al-Badrany et al., 2020). La incubación de espermatozoides en soluciones hiperosmóticas, como las de los diluyentes con glicerol y sacarosa usados en nuestro estudio, causa deshidratación celular severa, que para efectos de la criopreservación tiene el propósito de evitar el criodaño por formación de cristales intracitoplasmáticos, pero provoca daños irreversibles en la membrana plasmática, y a concentraciones muy elevadas, lisis celular (Gao et al., 1993). No obstante, la toxicidad que ejerció la sacarosa, a través de un mecanismo aún no descrito, y el período de exposición a este disacárido, es probablemente la causa por la cual los espermatozoides epididimarios bovinos fueron afectados cuando se expusieron a 100 mM de sacarosa.

Ramonez et al. (2017), mencionan que usar sacarosa en conjunto con trehalosa como crioprotector en bajas concentraciones (20 mM sacarosa – 25 mM trehalosa) no mejoraron las características físicas de los espermatozoides bovinos. Por el contrario, los estudios realizados por Al-Badrany et al. (2020) y por El-Sheshtawy et al. (2015) en muestras eyaculadas de semen bovino, indicaron que usar en conjunto trehalosa (50 mM) o sacarosa (100 mM) tuvo efectos positivos en varias características espermáticas luego de la congelación – descongelación. En cambio, la adición de 100 mM de sacarosa en nuestro estudio tuvo un efecto inicial nocivo ya que desmejoró la calidad de los espermatozoides, motivo por el cual luego de la congelación ultrarrápida y el calentamiento, estas muestras tuvieron características cinéticas e integridad de membranas plasmáticas muy por debajo de las muestras criopreservadas mediante congelación convencional. Según estos hallazgos, la congelación lenta con 5% de glicerol constituye una mejor opción para criopreservar muestras de espermatozoides epididimarios colectados postmortem.

Al utilizar como crioprotector al glicerol se pudo observar mejores resultados en los parámetros cinéticos, como motilidad total y progresiva, así como en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal. En un estudio realizado en caprinos en el que se usó glicerol al 7% se obtuvieron resultados favorables en el parámetro motilidad progresiva (Trujillo García, 2017). En bovinos, el crioprotector más utilizado es el glicerol que debido a su toxicidad se

utiliza en concentraciones bajas (<8%) (Jiménez-Rabadán et al., 2015); en nuestro estudio 5% de glicerol como crioprotector en la congelación lenta produjo mejores resultados que 100 mM de sacarosa en la congelación ultrarrápida.

La diferencia en la integridad de las membranas plasmática y acrosomal entre la congelación lenta y la ultrarrápida pudo deberse a las diferencias en la velocidad de enfriamiento y descongelamiento. De hecho, se presume que, al utilizar tasas de enfriamiento rápidas, durante el proceso de transición, se provocan daños por choque de frío, que conllevan a una modificación de la membrana plasmática y acrosomal por el aumento de su permeabilidad y disminución de la actividad metabólica (Demyda-Peyrás et al., 2018). Por el contrario, la congelación lenta permite una tasa de enfriamiento más gradual, lo que puede reducir el estrés osmótico en los espermatozoides y minimizar el daño en las membranas celulares durante el proceso de criopreservación (Shah et al., 2016).

Así mismo, el método de congelación lenta, ya sea con o sin selección, causó algunos cambios significativos en la morfometría. Por ejemplo, el área y la regularidad de la cabeza espermática y el área de la pieza intermedia fueron mayores en las muestras criopreservadas mediante congelación ultrarrápida que por congelación lenta. En tal sentido, Maroto-Morales et al. (2016), indicaron que un área de cabeza de espermatozoides más pequeña está asociada con una mejor calidad espermática y una mayor fertilidad. Esto se debe a que una cabeza más pequeña puede indicar que el espermatozoide tiene una mejor condensación de la cromatina y una mayor capacidad para penetrar en el óvulo. Asimismo, estos hallazgos mostraron que la regularidad de la cabeza fue significativamente mayor en los espermatozoides criopreservados mediante congelación lenta en comparación con los de congelación ultrarrápida. Este hecho es favorable a la congelación lenta, ya que la regularidad define la corrección de la forma de la cabeza, y a mayor regularidad mayor simetría de la cabeza espermática (Banaszewska et al., 2015).

Por otro lado, la rugosidad puede tomarse como un indicador del daño a la membrana del espermatozoide; entre mayor daño, mayor rugosidad (Buzón, 2013). Tal es así, que en nuestro estudio los valores de rugosidad fueron mayores en congelación ultrarrápida que en congelación lenta. Por lo tanto, tomando en conjunto los hallazgos de este estudio, los espermatozoides epididimarios sometidos a selección espermática antes de la criopreservación y congelados mediante el método convencional, tendrían mayor capacidad fecundante que su contraparte criopreservada mediante congelación ultrarrápida. No obstante, serían necesarios nuevos estudios para probar esta teoría, por ejemplo, mediante fecundación in vitro.

Finalmente, este estudio demostró que tanto el método de congelación como la selección espermática no afectaron la integridad de la cromatina de los espermatozoides epididimarios bovinos después de la congelación; sin embargo, se observó una diferencia numérica que mostró que la congelación ultrarrápida redujo la proporción de espermatozoides con el ADN fragmentado, mientras que la selección espermática en ambos métodos de criopreservación la incrementó.

La integridad de la cromatina es un factor crítico para el éxito de la fertilización (Kumaresan et al., 2020). Los espermatozoides con cromatina dañada tienen una menor capacidad para fertilizar el ovocito y pueden resultar en la producción de embriones anormales. Por lo tanto, la mejora de la integridad de la cromatina en los espermatozoides congelados es importante para la producción de embriones saludables (Volkers, 2019). Por lo que, se estima que la congelación ultrarrápida según Dogan et al. (2014), puede generar daño térmico debido a la rápida formación de hielo, lo que puede provocar daños en la membrana celular y la cromatina espermática. En cambio, en la congelación lenta la tasa de enfriamiento es más lenta, por lo que los espermatozoides se adaptan mejor al proceso de congelación y evitan la formación rápida de cristales de hielo, mismos que pueden dañar la membrana celular y la cromatina espermática (Shah et al., 2016).

En resumen, la criopreservación de espermatozoides es una técnica importante para preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva en el ganado bovino. Sin embargo, el proceso de criopreservación puede afectar la calidad cinética de los espermatozoides debido a la formación de cristales de hielo. La selección espermática y el método de congelación son factores clave que afectan la calidad cinética y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides. Los estudios demuestran que la selección espermática puede mejorar la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides antes y después de la criopreservación, y que la congelación lenta fue más efectiva que la congelación ultrarrápida para preservar la calidad cinética y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal. En conjunto, la selección espermática y el método de congelación deben ser cuidadosamente considerados en la criopreservación de espermatozoides epididimarios para garantizar su calidad y viabilidad.

Conclusiones

1. La selección espermática por gradientes de densidad de Percoll junto con congelación lenta resultó la opción más idónea para criopreservar espermatozoides epididimarios bovinos.
2. Independientemente del método de congelación, la selección espermática mejoró la cinética y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios bovinos.
3. Los espermatozoides criopreservados mediante congelación lenta tuvieron mejores parámetros cinéticos y una mayor proporción de espermatozoides con las membranas plasmática y acrosomal intacta.
4. El método de congelación afectó el ancho y área de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides, así como también la rugosidad y regularidad, mientras que la selección espermática solo afectó el ancho y el área de la pieza intermedia.
5. La integridad del ADN no fue afectada ni por el método de congelación ni por la selección espermática.

Referencias

- Al-Badrany, Q. M., Al-Badry, K. I., Zalzal, S. J., Ibrahim, F. F., & Lateef, W. Y. (2020). Effect of different concentration of trehalose or sucrose to tris diluents on some properties of sperms for holstein bulls during dilution, cooling and freezing. *Plant Archives*, 20, 1953–1960.
- Alanis, E. (2020). “La proteína E2 del VPH-16 activa la apoptosis en la línea celular C33A que expresa a los oncogenes virales E6 o E7.” *Universidad Autónoma Del Estado de Morelos*, 1.
- Albers, M., & Barrios, D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Tropical*, 24(3), 267–280.
- Andrade, A., & Palma, R. (2020). *Efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros*. [Informe de trabajo de titulación, ESPAMMFL]. Repositorio Digital ESPAM. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1302/1/TTMV05D.pdf>
- Anzar, M., Rajapaksha, K., & Boswall, L. (2019). Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLoS ONE*, 14(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223977>
- Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marín, C. C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.008>
- Arraztoa, C. C., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Trasorras, V. L., Gambarotta, M. C., & Neild, D. M. (2017). Porcine sperm vitrification II: Spheres method. *Andrologia*, 49(8), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.12738>
- Banaszewska, D., Czubaszek, M., Walczak-Jędrzejowska, R., & Andraszek, K. (2015). Morphometric dimensions of the stallion sperm head depending on the staining method used. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(2), 263–270. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0039>
- Behnamifar, A., Bernal, B., Torres, O., Chincoya, H. L., GGil, M., García-Casado, P., Rahimi, S., Woelders, H., & Moreno, J. S. (2021). Research Note: Evaluation of two methods for adding cryoprotectant to semen and effects of bovine serum albumin on quality characteristics of cryopreserved rooster spermatozoa. *Poultry Science*, 100(6), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101093>

- Benítez, E., Chamba, H., & Sánchez, E. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem Comparative evaluation of two methods of spermatic recovery of epididymis bovine post-mortem. *Avanico Veterinario*, 8(1), 59–74.
- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *In Vet.*, 13(2), 1–10. <http://www.fvet.uba.ar/publicaciones/archivos/vol13-v2/Vol-13-N-2-Articulo-III.pdf>
- Bollwein, H., & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*, 15(Irrs), 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>
- Bóveda, P., Estesó, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Muñiz, A., Prieto, P., Mejía, O., Ungerfeld, R., & Santiago-Moreno, J. (2018). Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 192(November 2017), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.010>
- Bóveda, P., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Estesó, M. C., López-Sebastián, A., Rizos, D., Bielli, A., Ungerfeld, R., & Santiago-Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLoS ONE*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Buzón, A. (2013). Análisis cinético del espermatozoide del caballo bajo el sistema Sperm Class Analyzer. *Universidad de Córdoba facultad de veterinaria*, 74–75. <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/11586/2014000000902.pdf?sequence=>
- Cabrera, V. P. & Pantoja, A. C. (2012). Viabilidad Espermática E Integridad Del Acrosoma En Semen Congelado De Toros Nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2), 192–200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Calle, C. (2020). *Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, provincia de Morona Santiago, Ecuador.*
- Carpio, S. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino : yema de huevo vs leche descremada. *Universidad Politécnica Salesiana*, 0–83. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7955>
- Chłópek, A., & Wysokińska, A. (2020). Canine spermatozoa—What do we know about their

- morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(2), 113–126. <https://doi.org/10.1111/rda.13596>
- Ciereszko, R., & Dusza, L. (2016). Reproductive anatomy and physiology of bulls. In *Handbook of Large Animal Practice* (5th ed., pp. 551-555). Elsevier.
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., & Hidalgo, M. (2019). Low-density lipoproteins and milk serum proteins improve the quality of stallion sperm after vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), 86–89. <https://doi.org/10.1111/rda.13495>
- Cuaran, E., & Burbano, J. (2014). *Evaluación En La Criopreservación De Semen Colectado Directamente De Epidídimos En Bovinos Por Dos Métodos (Laundering - Epididymis, Slicing - Testicles)*.
- Cueva Hurtado, R. C. (2018). Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de Vicugna pacos “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. *Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*, 92. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2835>
- Cueva, E. & Moya, M. (2015). Evaluación de tres crioprotectores para el almacenamiento en nitrógeno líquido de semillas de orquideas nativas de Ecuador de los cuatro generos. Ingenieras en biotecnología de los recursos naturales. Universidad politécnica salesiana sede Quito, Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9218/1/UPS-QT06860.pdf>
- Cunha, A. T. M., Carvalho, J. O., Guimarães, A. L. S., Leme, L. O., Caixeta, F. M., Viana, J. H. M., & Dode, M. A. N. (2019). Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. *PLoS ONE*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209692>
- Cruz, D. (2015). Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino. *Ingeniero Agrónomo Zootecnista*. Universidad autónoma agraria “antonio narro” división de ciencia animal, Mexico. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3781/T20276%20CRUZ%20SOLIS,%20DIEGO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Da Costa e Silva, E., Rocha, C. C., Zanini, S. F., Santos, F. C. A., Wohlres-Viana, S., & Dell'aqua Jr, J. A. (2018). Influence of age and breed on epididymal sperm characteristics and in vitro fertilizing ability in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls. *Theriogenology*, 119, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.019>

- Demyda-Peyrás, S., Bottrel, M., Acha, D., Ortiz, I., Hidalgo, M., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., Gósalvez, J., & Dorado, J. (2018). Effect of cooling rate on sperm quality of cryopreserved Andalusian donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 193(2010), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.069>
- Dogan, F., Armagan, A., Oksay, T., Akman, T., Aylak, F., & Bas, E. (2014). Impact of micronised purified flavonoid fraction on increased malondialdehyde and decreased metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 levels in varicocele: Outcome of an experimentally induced varicocele. *Andrologia*, 46(4), 380–385. <https://doi.org/10.1111/and.12091>
- Domínguez, H. (2021). *Posible papel diferencial de la autofagia en respuesta al estrés proteico en microglía y neuronas* [Memoria presentada para optar al grado de doctor, Universidad de Sevilla]. Departamento de bioquímica y biología molecular. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/133369/Dominguez%20Martin%2C%20Helena%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Domínguez-Rebolledo, A. E., Estrada-Mata, E., Ávila-Espitía, F., & López-Urueña, E. (2016). Comparison of epididymal and ejaculated sperm from Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, 166, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.016>
- Durairajanayagam, D., Agarwal, A., Ong, C., & Prashast, P. (2015). Lycopene and male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 17(2), 323-328.
- Elgueta, C. (2018). Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos. Médico veterinario. Universidad de las Américas facultad de medicina veterinaria y agronomía escuela de medicina veterinaria, Chile. <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A., & El-Nattat, W. S. (2015). Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 26–31. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60053-1](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60053-1)
- Farroñan, K. (2021). Uso del test de termorresistencia para evaluar la viabilidad del semen congelado de los toros del banco nacional de semen. Ingeniera Zootecnista. Universidad nacional Pedro Ruiz Gallo facultad de ingeniería zootecnia escuela profesional de ingeniería zootecnia, Peru. <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/10095/Karesly%20Jackeline%20Farro%20Chapo%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine.

Spanish Journal of Agricultural Research, 1(2), 17. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>

- Galarza, A., Landi, B., & Mejía, E. (2021). Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie *Canis Lupus familiaris*. *Universidad de Cuenca*, 47.
- Galarza, D. A., Ladrón de Guevara, M., Beltrán-Breña, P., Sánchez-Calabuig, M. J., Rizos, D., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk- and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*, 133, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.027>
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192(2010), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.022>
- Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, 49(1), 112–123. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.1.112>
- García, Y. (2016). Análisis de las características seminales de toros de la raza criolla colombiana blanco orejinegro (bon). *Zootecnista*. Universidad de cundinamarca facultad de ciencias agropecuarias programa de zootecnia fusagasugá 2016, Colombia. <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/1434/TESIS%20Maritza.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Gómez, J. (2019). *Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de Guerrero en el LAPROSEM-UAGro*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Guerrero]. Repositorio Institucional de Ciencia Abierta. http://ri.uagro.mx/bitstream/handle/uagro/1384/TM_17250143_19.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- González-Márquez, H., Rodríguez-Estrada, R. B., Herrera-Martínez, J. A., & León-Galván, F. (2016). Evaluation of the morphometry and ultrastructure of bovine epididymal sperm. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 15(12), 247-253. <https://doi.org/10.3923/javaa.2016.247.253>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw

- quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Hoogewijs, M., Morrell, J., Van Soom, A., Govaere, J., Johannisson, A., Piepers, S., De Schauwer, C., De Kruijff, A., & De Vliegher, S. (2011). Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, 43(SUPPL.40), 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x>
- Isachenko, E., Isachenko, V., Sanchez, R., Katkov, I. I., & Kreienberg, R. (2011). *Cryopreservation of spermatozoa. Old routine and new perspectives*. 176-198 Principles and Practice of Fertility Prese. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511921896.017>
- Jara, D., & Paredes, B. (2021). *Evaluación de dos métodos de selección espermática por centrifugación y flotación de esperma canino epididimario fresco y criopreservado*. [Trabajo de titulación, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/36793/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.004>
- Johnson, L. A., Flook, J. P., Look, M. V., & Hafner, K. S. (2019). Effect of cryopreservation on the acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 501-505
- Kipper, B. H., Trevizan, J. T., Carreira, J. T., Carvalho, I. R., Mingoti, G. Z., Beletti, M. E., . . . Burkhardt de Koivisto, M. (2016). Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on in vitro fertilization. *Theriogenology*.
- Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>
- Liu, Sh. H., Ma, X. Y., Yue, T. T., Wang, Z. C., Qi, K. L., Li, J. C., Lin, F., Rushdi, H. E., Gao, Y. Y., Fu, T., Li, M., Gao, T. Y., Yang, L. G., Han, X. L., & Deng, T. X. (2021).

- Transcriptome-Wide m6A Analysis Provides Novel Insights Into Testicular Development and Spermatogenesis in Xia-Nan Cattle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.791221>
- López-Uruena, E., et al. (2021). Alpha-lipoic acid supplementation in a soybean lecithin-based semen extender improves sperm motility, morphology and bioenergetics in cryopreserved bull spermatozoa. *PLoS One*, 16(5), e0251911.
- Luzon, F. (2015). “Estudio de dos métodos de colecta de espermatozoides epididimarios en toros post mortem”. Médico Veterinario Zootecnista. Universidad nacional de Loja, Ecuador.
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/10250/1/TESIS%20MVZ%20Lista.pdf>
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking*, 17(2), 171–182. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>
- Machorro-Ramírez, L. Á., Alba-Quiróz, L., Paredes-Guiñán, O. J., Monsalve-Flores, C., Valdez-Morales, F. J., & Valdés-Carrillo, A. (2018). Evaluation of the integrity of sperm DNA and its impact on the seminal parameters of infertile males. *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, 86(11), 699–708.
- Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Ramón, M., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M., Soler, A., & Garde, J. (2016). Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 863–870. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.187581>
- Martins, C. F., Dode, M. N., Bão, S. N., & Rumpf, R. (2007). The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genetics and Molecular Research*, 94-104.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), 125-142.
- Mejia, J. (2017). “Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo”. Magister en Reproducción Animal. Universidad de cuenca facultad de ciencias agropecuarias maestria en reproducción animal., Ecuador. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26940/1/Tesis.pdf>
- Mohamed, M. S. A. (2015). Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *International Journal of Reproductive*

BioMedicine, 13(10), 633–644.

- Moncayo, S. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. Ingeniera en biotecnología de los recursos naturales. Universidad politécnica salesiana sede Quito, Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11654/1/UPS-QT09284.pdf>
- Moreno, A. & Murillo, K. (2001). Implementación de la coloración de naranja de acridina en el diagnóstico de biofilms en catéteres. *Pontificia universidad javeriana facultad de ciencias basicas carrera bacteriologia*, 22, 11. <http://www.cdc.gov/elcosh/docs/d0600/d000645/d000645.htm>
- Morrell, J. M., Kumaresan, A., & Johannisson, A. (2017). Practical implications of sperm selection techniques for improving reproduction. *Animal Reproduction*, 14(3), 572–580. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1000>
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2016). Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. *American Journal of Analytical Chemistry*, 07(08), 597–610. <https://doi.org/10.4236/ajac.2016.78055>
- Muñoz, A. (2019). “Correlación de la circunferencia escrotal con volumen de eyaculado y concentración espermática en cuatro razas ovinas”. Médico Veterinaria Zootecnista. Universidad autónoma del estado de México facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Mexico. http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/110406/Tesis_%20Alma%20Sofia%20sin%20dedi%20y%20agra.pdf?sequence=5
- Nag, P., Kumaresan, A., Akshaya, S., Manimaran, A., Rajendran, D., Paul, N., Sharma, A., Karuthadurai, T., Kaustubh, S., Jeyakumar, S., & Ramesha, K. (2021). Sperm phenotypic characteristics and oviduct binding ability are altered in breeding bulls with high sperm DNA fragmentation index. *Theriogenology*, 172, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.06.006>
- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallmann, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., & Isachenko, E. (2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo-Letters*, 23(2), 93–102.
- Núñez Villalobos, A., & Rubio Molina, A. A. (2015). Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras*, 1–26. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/4610>
- O’Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda,

- L., López-Sebastián, A., Martínez-Navado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., & Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, *129*, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
- Oliva, R., Barrachina, F., Soler-Ventura, A., de la Iglesia, A., Castillo, J., Jodar, M., & Ballescà, J. L. (2017). Proteómica del espermatozoide. *ASEBIR: Embriología Clínica y Biología de la Reproducción 9ed.* *22*(2), 24–27. file:///C:/Users/PC_S/Downloads/Dialnet-ProteomicaDelEspermatozoide-6919969.pdf
- Papa, P. M., Papa, F. O., Oliveira, L. A., Guasti, P. N., Castilho, C., & Giometti, I. C. (2015). Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, *161*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.004>
- Pérez, J., Giovanni Restrepo, B., & Alexandra Usuga, S. (2021). Quality of bovine semen diluted and frozen in an extender with sodium caseinate. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *32*(6), 1–11. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I6.21699>
- Pérez, L. (2020). *Evaluación de dos curvas de congelación programables en la criopreservación de semen ovino en el Centro Experimental Uyumbicho*. [Tesis de titulación, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital de la Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20635/1/T-UCE-0014-MVE-094.pdf>
- Pradieé, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., O'Brien, E., Estes, M. C., Beltrán-Breña, P., Maillo, V., Santiago-Moreno, J., & Rizos, D. (2018). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, *108*, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.021>
- Proaño, B. (2013). Fertilización in-vitro con espermatozoides criopreservados de la especie *Rhinella marina* e identificación de malformaciones en los embriones obtenidos. *Journal of the American Chemical Society*, *123*(10), 2176–2181. <https://shodhganga.inflibnet.ac.in/jspui/handle/10603/7385>
- Ramonez, J., Ladívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez Saldaña, D. (2017). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. *Maskana*, 109–111.
- Ratto, M. H., Huanca, W., & Adams, G. P. (2018). Evaluation of a non-penetrating cryoprotectant for bovine sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, *189*, 138-142.

- Restreto Betancur, G., Vasquez Araque, N., & Andres Garcia, E. (2009). Artificial insemination cryopreservation of canine semen and its application in Resumen. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 119–129.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Saabedra, G. (2018). Conservación seminal en toros Cebú. Efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación. Universidad de Zaragoza, España. <https://zaguan.unizar.es/record/69214/files/TESIS-2018-020.pdf>
- Sabés-Alsina, M., Lundeheim, N., Johannisson, A., López-Béjar, M., & Morrell, J. M. (2019). Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 5623–5633. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15837>
- Saravia, F., et al. (2017). Apoptosis in bovine spermatozoa: a review. *ISRN veterinary science*, 2017.
- Saray, K. (2021). Hipertrofia testicular por hidrocele en un toro Simmental. Medico Veterinario. Universidad de Pamplona, Colombia. http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/879/1/Saray%20_2021_TG.pdf
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., & Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, 4(5), 972–976. <https://doi.org/10.1111/andr.12214>
- Silva, S. V., Afonso, J. A. B., Vieira, L. A., Martins, T., & Correia, A. (2016). Effect of dietary supplementation of vitamin E and selenium on semen quality of Alentejana boars and evolution of their libido. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2748-2756.
- Smith, S. L., et al. (2020). Evaluation of cryoprotectant concentration on post-thaw quality of bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 212, 106236.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., & Savignone, C. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservacion sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 28–35.
- Torres, M. A., Escobar, S. C., Peña-Mendoza, A., Ramírez-Iglesias, J. R., Barrera, X. S., Duque-Pulgar, F. A., ... & Parra-Forero, L. (2019). Trehalose improves motility, plasma

- membrane integrity and mitochondrial membrane potential of bovine sperm after vitrification by modifying intracellular sugar content. *Theriogenology*, 126, 163-170.
- Trujillo García, D. A. (2017). Criopreservación de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente. *Ciencia.Lasalle.Edu.Co*, 1(1), 1–50.
- Tvrda, E., Greifová, H., Mackovich, A., Hashim, F., & Lukáč, N. (2018). Curcumin offers antioxidant protection to cryopreserved bovine semen. *Czech Journal of Animal Science*, 63(7), 247–255. <https://doi.org/10.17221/33/2017-CJAS>
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Van Soom, A., Wrathall, A. E., Herrler, A., Nölting, C., & Beck, J. (2016). Cryopreservation of bull semen. *Animal Reproduction Science*, 169, 30-36.
- Valverde, E. (2016). Efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 °C) de epidídimos provenientes de toros de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides”. Magister en Reproducción Animal. Universidad de cuenca facultad de ciencias agropecuarias maestría en reproducción animal., Ecuador. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24313/3/tesis.pdf>
- Viera, M. (2018). Estacionalidad y criopreservación de semen en chivos de Gabón. *INIA*, 59.
- Villamil, Alejandro & Lombana, H. (2021). FUNDAMENTOS Y MÉTODOS PARA LA DILUCIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN EN BOVINOS Fundaments and methods for the dilution and freezing of bovine semen Abstract Sperm preservation is one of the most important advances in reproductive technologies for bovine males d. *Universidad Cooperativa de Colombia Sede Villavicencio - Meta, Colombia*. https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/34389/7/2021_fundamentos_métodos_dilución.pdf
- Viquez, G. (2020). Evaluación de la calidad seminal en bovinos (*Bos indicus*) y la estructura subpoblacional del eyaculado mediante un sistema casa-mot. Ingeniería en Agronomía. Instituto tecnológico de costa rica, Costa Rica. https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/12276/evaluacion_calidad_seminal_bovinos_estructura.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Volkers, M. (2019). Efeitos da presença do plasma seminal sobre a integridade de membranas, cromatina e citoesqueleto de espermatozoides de touros. *Ayaz*, 8(5), 55.

- Watson, P. F. (2000). *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Animal Reprod Sci.* 2;60-61:481-92. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3. PMID: 10844218.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplantation*, 30, 1–12. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>
- Zambrano, J. & Moreira, Y. (2022). Evaluación de caracteres reproductivos en toros prepúberes mestizos cebú y el efecto de la gonadotropina coriónica equina. *Medico Veterinario. Escuela superior politécnica agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Ecuador*. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1773/1/TTMV44D.pdf>
- Zhao, Y., Sun, X., & Zhang, H. (2020). The role of epididymal proteins in sperm maturation and fertilization. *Andrology*, 8(3), 582-590. <https://doi.org/10.1111/andr.12671>
- Zuidema, D., Kerns, K., & Sutovsky, P. (2021). An exploration of current and perspective semen analysis and sperm selection for livestock artificial insemination. *Animals*, 11(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani11123563>

Anexos

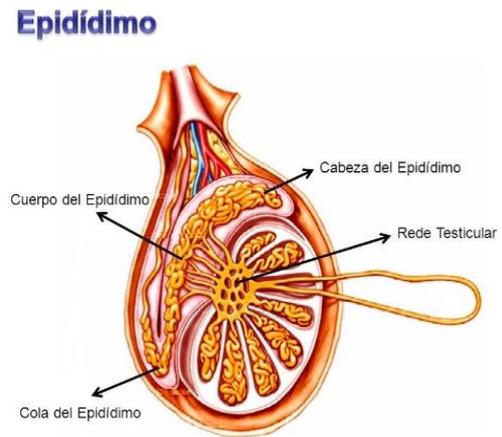
Anexo A

Testículos de toros de camal



Anexo B

Esquema anatómico del epidídimo de toros



Anexo C

Extracción de muestras seminales de testículos de toros de camal



Anexo D

Muestras seminales obtenidas del epidídimo de toros de camal



Anexo E

Formación de pools

**Anexo F**

Evaluación pre-congelación mediante el Sistema CASA

**Anexo G**

Pajuelas listas para congelación lenta - T1 y T2

**Anexo H**

Formación de pellets - congelación ultrarrápida



Anexo I

Platina térmica para calentamientos y materiales necesarios para la descongelación

**Anexo J**

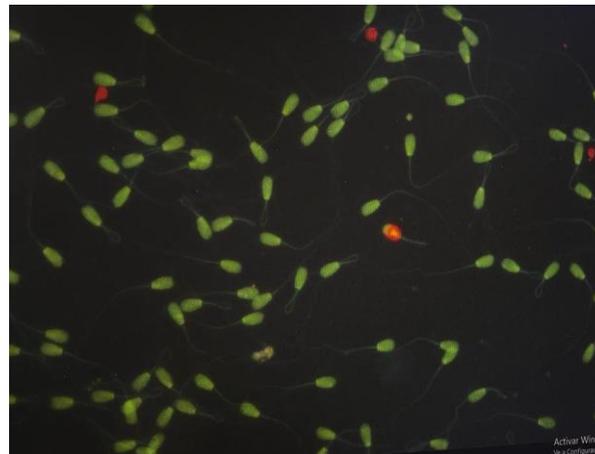
Realización de frotis para morfometría y para evaluación de la integridad de ADN

**Anexo K**

Laminillas para la evaluación de morfometría

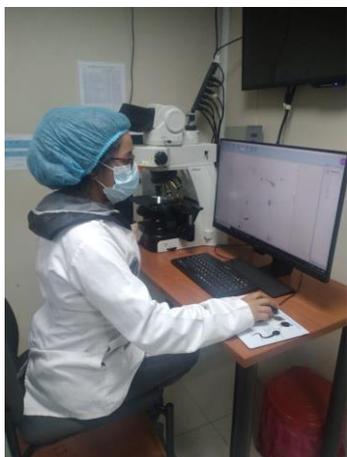
**Anexo L**

Evaluación de la integridad de la cromatina mediante la tinción Naranja de Acridina



Anexo M

Evaluación de la morfometría



Anexo N

Visualización de la morfometría de los espermatozoides mediante el Sistema CASA



Anexo O

Evaluación de la morfometría de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides epididimarios bovinos mediante el Sistema CASA

