

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto del resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos congelados y vitrificados

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


Autores:

Pamela Michell López Miranda

Michelle Estefanía Lituma Piña

Director:

Edwin Francisco Larriva González

ORCID:  0009-0009-8531-7405

Cuenca, Ecuador

2024-03-18

Resumen

La investigación evaluó el impacto del Resveratrol (RES) en la criosupervivencia de espermatozoides equinos, utilizando congelación convencional (C) y vitrificación cinética (V). Se recolectaron 16 muestras de semen de 4 caballos españoles y se dividieron en cuatro grupos: C-RES, C-Co, V-RES y V-Co, según el método de criopreservación (C o V) y la presencia de RES (10 o 0 μ M). Durante la congelación, se utilizaron pajuelas de 0,5 mL con dimetilformamida al 5%, mientras que para la vitrificación se empleó 100 mM de trehalosa y sumergiendo las muestras en gotas de 30 μ L en NL₂. Los resultados revelaron que los tratamientos con RES, especialmente en C-RES, mejoraron la motilidad total y progresiva en comparación con V-RES y V-Co. Además, la velocidad curvilínea (VCL) fue más alta en C-RES y C-Co que en V-RES. Por otro lado, los valores de linealidad (LIN) y oscilación lateral (WOB) fueron más elevados en los tratamientos de V-RES y V-Co. Se observaron mayores niveles de integridad plasmática y acrosomal en C-RES, y menor fragmentación de ADN en estos grupos. También se detectó un efecto antioxidante del RES, reduciendo el estrés oxidativo en C-RES en comparación con C-Co. En conclusión, el RES mejoró la criosupervivencia de los espermatozoides equinos, evidenciándose en la motilidad y la integridad celular, y reduciendo la fragmentación del ADN y el estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren el potencial uso del RES como un aditivo en los protocolos de criopreservación del semen equino para mejorar la eficacia de la reproducción asistida en equinos.

Palabras clave: fertilidad equina, espermatozoides, congelación, calidad seminal



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.
Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The research assessed the impact of Resveratrol (RES) on the cryosurvival of equine sperm using conventional freezing (C) and kinematic vitrification (V). Sixteen semen samples from 4 Spanish horses were collected and divided into four groups: C-RES, C-Co, V-RES, and V-Co, based on the cryopreservation method (C or V) and RES presence (10 or 0 μM). During freezing, 0.5 mL straws with 5% dimethylformamide were used, while vitrification employed 100 mM trehalose and submersion in 30 μL drops in LN2. Results showed that RES treatments, especially C-RES, enhanced total and progressive motility compared to V-RES and V-Co. Additionally, curvilinear velocity (VCL) was higher in C-RES and C-Co than in V-RES. Conversely, linearity (LIN) and lateral oscillation (WOB) values were higher in V-RES and V-Co treatments. Increased levels of plasma and acrosomal integrity were observed in C-RES, with lower DNA fragmentation in these groups. An antioxidant effect of RES was also detected, reducing oxidative stress in C-RES compared to C-Co. In conclusion, RES improved equine sperm cryosurvival, as evidenced by enhanced motility and cellular integrity, along with reduced DNA fragmentation and oxidative stress. These findings suggest the potential use of RES as an additive in equine semen cryopreservation protocols to enhance the efficacy of assisted reproduction in horses.

Keywords: equine fertility, sperm, freezing, seminal quality



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights. Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	12
Objetivos	14
a. Objetivo General	14
b. Objetivo Especifico.....	14
Hipótesis.....	15
Revisión de literatura	16
2.1. Criopreservación	16
2.1.1. Métodos de criopreservación	16
2.1.2. Crioprotectores (CPO)	17
2.1.3. Factores que determinan la crioresistencia espermática	21
2.1.4. Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen equino	23
Materiales y métodos.....	26
3.1. Materiales	26
3.1.1. Materiales físicos.....	26
3.1.2. Materiales biológicos.....	27
3.1.3. Reactivos	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Área de estudio	28
3.2.2. Elaboración de diluyentes y medios	28
3.2.3. Diseño experimental.....	30
3.2.5. Criopreservación de muestras	32
Resultados.....	36
4.1. Cinemática.....	36
4.2. Integridad de membranas	39
4.1. Fragmentación de ADN	41
4.1. Estrés oxidativo.....	41
Discusión.....	43
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Referencias	53
Anexos	64

Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo del RES	25
Figura 2: Ubicación geográfica del área de estudio	28
Figura 3: Porcentajes total de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides frescos y criopreservados	29
Figura 4: Velocidades curvilíneas (VCL) y rectilíneas (VSL) junto con sus trayectorias rápidas progresivas (VCL-RAP y VSL-RAP) de espermatozoides.....	37
Figura 5: Rectitud (STR), Linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides frescos y criopreservados	38
Figura 6: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de caballo frescos y criopreservados	39
Figura 7: Fragmentación de ADN (%) de espermatozoides de caballo criopreservados	41
Figura 8: Estrés oxidativo (EO, %) moderado, intenso y total de espermatozoides de caballo criopreservados	42

Índice de tablas

Tabla 1: Diluyente Botusemen Gold	28
Tabla 2: Diluyente Botusemen special.....	29
Tabla 3: Medio de HEPES para fluorescencia	29
Tabla 4: Yoduro de propidio	29
Tabla 5: Aglutinina.....	29
Tabla 6: TALP	30
Tabla 7: PBS.....	30
Tabla 8: Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia	40

Agradecimiento

Primero que nada, quiero agradecer a Dios y a la virgen, por haberme dado la fuerza y valentía para venir a cumplir uno de mis sueños que fue cursar esta hermosa carrera en una nueva ciudad, donde todo para mí fue nuevo, y que al inicio si fue un poco difícil pero con el tiempo me acostumbre a mi nueva vida; en segundo a mis abuelos Juana Miranda, Benigno López, Bella Cali, y Armando Zúñiga quienes me criaron desde pequeña y más que mis abuelos fueron mis padres, gracias por enseñarme a ser fuerte y nunca rendirme, y por siempre estar conmigo en cada paso, a mis padres Vicky López e Ítalo Zúñiga , que a pesar de la distancia, siempre estuvieron al pendiente de mí, y apoyándome en cada decisión que he tomado hasta el momento; gracias por siempre confiar en mis capacidades y por cada palabra de ánimo que me daban.

De manera especial al Dr. Francisco Larriva director de este trabajo de titulación, que junto con el Dr. Andrés Galarza y el Dr. Mauricio Dumas, nos guiaron en cada paso para culminar con éxito esta investigación, compartiéndonos su sabiduría y tiempo, y siempre alentándonos a mejorar cada día.

A mi compañera de tesis, que más que amiga se volvió una hermana Michelle Lituma que durante estos largos años siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas, gracias por confiar en mi para realizar juntas este trabajo de investigación, y poder cumplir uno de nuestros sueños; de igual forma agradezco a mis amigos Adriana Astudillo, Estefanía Torres, y Jefferson Erraez, ustedes se volvieron parte de mi familia, y me acompañaron en esta etapa tan bonita, sin ustedes mi vida universitaria no hubiera sido igual, eternamente agradecida por haberlos conocido, y por cada momento compartido.

Para finalizar agradezco a los docentes quienes en estos largos 5 años, me compartieron su experiencia y conocimientos, y siempre me motivaron para ser una excelente profesional.

Pamela Michell López Miranda

Agradecimiento

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme cumplir una meta más en mi carrera profesional, guiando cada paso hacia el éxito personal. De manera especial, agradezco a mi querida madre, María, quien es un pilar muy importante en mi vida, quien gracias a su esfuerzo y cariño he llegado a esta etapa junto a su mano.

A mi querida abuela, Rosa, quien considero como mi segunda madre, pues sus enseñanzas y valores inculcados desde mi infancia, fueron esenciales a lo largo de mi vida.

A mi pequeña hermana, Carla, cuyo apoyo y motivación fue indispensable para momentos difíciles y complicados.

Expreso de manera especial mi agradecimiento a nuestro director de tesis, Dr. Francisco Larriva junto con el Dr. Andrés Galarza y Dr. Mauricio Dumas, quienes, con su experiencia, motivación y dedicación, lograron guiarnos en el desarrollo y finalización de este trabajo investigativo.

A mi incondicional amiga, Michell, quien considero como mi segunda hermana, ya que desde que la conocí estuvo presente en cada evento importante de mi vida, mi cómplice y fiel compañera, con la que voy a dar este gran paso en nuestra vida profesional.

A mi grupo de mejores amigos, Michell, Adriana, Estefanía y Jefferson, quienes formaron parte de mi etapa universitaria desde el inicio hasta el fin de esta, nos motivamos a graduarnos juntos y apoyarnos como el gran equipo que somos.

A mis docentes, quienes me incentivaron cada ciclo académico, a demostrar mi mayor esfuerzo en cada trabajo y lecciones, motivándome a no darme por vencida y seguir adelante.

Michelle Estefanía Lituma Piña

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado en especial a mis abuelos Juana Miranda, Benigno López, Bella Cali, y Armando Zúñiga, y a mis padres Vicky López, e Ítalo Zúñiga, los cuales fueron un pilar fundamental para que yo pudiera cumplir este sueño, todos mis logros se los debo a ustedes, en especial a una persona que hoy no puede estar aquí conmigo pero que sé que desde el cielo está orgullosa de mí, a mi Mami Juanita que añoraba con compartir este momento conmigo, esto va por ti mami, espero que en el cielo celebres conmigo, y me sigas acompañando en cada uno de mis sueños que aún me faltan por cumplir.

Y como no dedicarle todo este esfuerzo a mi Agust que estuvo conmigo todos estos largos años de vida universitaria, mi compañero de vida, mi mejor amigo, el que estuvo conmigo en cada desvelo, cada llorada y cada grito de felicidad, nunca me dejaste sola, siempre me acompañabas mientras me amanecía estudiando o haciendo trabajos, e incluso algunas veces te convertiste en paciente para mis prácticas, esto va para ti también mi pequeño, y espero poder seguir compartiendo más logros junto a ti.

Pamela Michell López Miranda

Dedicatoria

En especial, dedico mi trabajo a mi madre, quien tuvo el papel de madre y padre, supo brindarme grandes consejos y, sobre todo, un apoyo incondicional a lo largo de mi vida académica y personal.

Para mi abuela, hermana y mejores amigos, quienes considero personas muy importantes en mi vida, sin ellos no hubiera logrado seguir adelante, junto con su cariño y apoyo, alcanzaron a motivarme de la mejor manera en cada paso marcado en mi camino.

Para mi querido Toky, un amigo fiel y leal que me ha entregado la vida, mi compañero de cuatro patas, quien fue uno de mis motivos por estudiar esta carrera. Siempre lo guardaré en mi corazón con un gran recuerdo.

Michelle Estefanía Lituma Piña

Glosario

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- AMPK:** Proteína cinasa activada por AMP
- ATP:** Adenosín trifosfato
- ALH:** Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- C-Co:** Congelación convencional control
- CCF:** Cleveland clinic foundation
- CPA:** Agentes crioprotectores
- CPO:** Crioprotector permeable
- C-RES:** Congelación convencional con resveratrol
- DMF:** Dimetilformamida
- DMSO:** Dimetilsulfoxido
- DPDA:** Membrana plasmática y acrosoma dañados
- DPIA:** Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto
- EO:** Estrés oxidativo
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- GLY:** Glicerol
- GPx:** Glutación peroxidasa
- GSH:** Glutación
- Hz:** Frecuencia de batida de flagelo
- IA:** Inseminación artificial
- IPDA:** Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado
- IPIA:** Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto
- IS:** Irvine scientific
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad
- LIN:** Linealidad
- LPO:** Peroxidación lipídica
- MF:** Metilformamida
- MP:** Motilidad progresiva

MT: Motilidad total

NL₂: Nitrógeno líquido

PBS: Buffer fosfato salino

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

PI: Yoduro de propidio

FITC/PNA: Doble tinción fluorescente (fluorosceína-algutinina PNA)

RES: Resveratrol

S: Azufre

SOD: Superóxido dismutasa

STR: Índice de rectitud

SDFI: Índice de fragmentación del ADN

TCG: Tris-citrítico-glucosa

VA: Vagina artificial

VAP: Velocidad promedio del espermatozoide

VCL: Velocidad curvilínea

VCL-RAP: Velocidad curvilínea rápida progresiva

V-Co: Vitrificación cinética control

VIT: Vitrificación cinética

V-RES: Vitrificación cinética con resveratrol

VSL: Velocidad rectilínea

VSL-RAP: Velocidad rectilínea rápida progresiva

WOB: Índice de oscilación

YH: Yema de huevo

Introducción

La criopreservación del semen equino es una biotecnología reproductiva fundamental para la conservación de espermatozoides de caballos de alto mérito genético. Además, el uso del semen criopreservado permite optimizar el uso y transporte de dosis inseminantes para usar en programas de cruzamiento y mejora genética equina. Sin embargo, aún existe varios desafíos que deben ser superados para mejorar la criosupervivencia espermática debido a las múltiples criolesiones celulares causadas por choque de frío, estrés osmótico, estrés oxidativo, entre otros (Galarza *et al.*, 2023). Es por ello que los actuales protocolos de criopreservación de espermatozoides están direccionados a minimizar estas lesiones celulares, especialmente con el uso de diluyentes, aditivos-antioxidantes y velocidades de enfriamiento por aceleración (Galarza *et al.*, 2023).

El principal daño a los espermatozoides es ocasionado por el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se genera, principalmente, por el incremento de la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*) producido durante el enfriamiento (10 a 4°C), superenfriamiento (4 a -5°C) y congelación (Oliveira, 2013; Squires, 2013). Además, los radicales libres (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) tienen cierta predilección por los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés *polyunsaturated fatty acids*) presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides equinos que provocan una peroxidación lipídica (LPO, por sus siglas en inglés *lipid peroxidation*). Ante una falla en los mecanismos de defensa antioxidante del semen equino, la LPO provoca una reducción de su motilidad, viabilidad y, en última instancia, su capacidad fecundante de los espermatozoides (Restrepo, Pizarro, *et al.*, 2019).

Otro factor que determina la crioresistencia de espermatozoides es la velocidad de enfriamiento con la cual se congelan. Se ha determinado previamente que la congelación convencional (C) de espermatozoides mediante la exposición a vapores de nitrógeno líquido (NL₂) dentro de una rampa (a 4 cm de la superficie del NL₂) y caja de poliestireno, provoca velocidades de enfriamiento por desaceleración (Galarza *et al.*, 2019). Estos protocolos de congelación convencional causan muerte celular en una gran población espermática debido a que, al tener una velocidad de enfriamiento inicial rápida (Ej.

40°C/min), la célula no puede deshidratarse eficientemente y entonces se forma cristales de hielo intracelular que son letales (Mohamed Shehata Ali, 2015). Según Woelders y Chaveiro (2004) en su modelo de predicción de velocidades de enfriamiento óptimas, determinaron que el uso de velocidades de enfriamiento iniciales lentas (4 a 5°C/min) hasta el momento de la nucleación de hielo (*seeding*) y posterior a ello acelerar a velocidades de enfriamiento de 35 - 60°C/min, producen una mayor criosupervivencia espermática. En base a esto, Tamay *et al.* (2022) desarrolló un protocolo de congelación de espermatozoides de caballo de dos rampas a dos alturas dentro de una caja criogénica, que produjo velocidades de enfriamiento por aceleración (9,2°C/min, seguido por 19 °C/min y, finalmente, 47°C/min) y obtuvieron valores promisorios de viabilidad y motilidad de espermatozoides de caballo Peruano de paso fino. En base a estos antecedentes, el uso de protocolos de congelación de dos rampas podría ser una alternativa exitosa en la congelación de espermatozoides de caballo de raza Española.

Un protocolo alternativo a la congelación es la vitrificación cinética (V). La vitrificación cinética se basa en el uso de agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP) como carbohidratos (Ej. Disacáridos como la sacarosa y trehalosa) y altas velocidades de enfriamiento (> 20.000°C/min) (Horta *et al.*, 2017). Esto se logra sumergiendo directamente gotas de 30 µL de muestras espermáticas en NL₂. La principal ventaja es que al realizar este procedimiento alcanzaría un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo intracelulares o extracelulares (Horta *et al.*, 2017). En un estudio realizado por Consuegra *et al.*, (2019) en equinos donde compara la vitrificación y la congelación convencional, demuestra que la vitrificación obtiene mejores parámetros (MT, MP, integridad de membrana plasmática, acrosoma intacto), que la congelación convencional (MT, MP, integridad de membrana plasmática, acrosoma intacto). Así mismo otro estudio realizado en equinos menciona que el control de la temperatura es clave para una vitrificación exitosa, en donde la reducción progresiva de la temperatura en el periodo de equilibrio a 5°C ayuda a contribuir a la estabilización de las membranas espermáticas precongelación, haciendo más sencillo el flujo y eflujo de agua / crioprotector, y por lo tanto, las interacciones entre los aditivos y membranas espermáticas (Hidalgo *et al.*, 2018).

Varios aditivos y antioxidantes han sido adicionados al medio de congelación de espermatozoides para mitigar los efectos deletéreos provocados por el incremento de las

ROS, radicales libres y estrés oxidativo (Nallella *et al.*, 2004). Antioxidantes tales como los fosfatos, las beta aminoácidos, la BSA, y las pentofilina y cafeína han sido previamente evaluados para mejorar la congelabilidad de espermatozoides equinos (Ijaz & Ducharme, 1995; Rees *et al.*, 1990). No obstante, la criosupervivencia espermática no ha sido mejorada en algunas razas de caballos incluyendo a la española. Es por ello, que la inclusión de nuevos aditivos-antioxidantes al medio de congelación o vitrificación debe ser fundamental para mitigar los efectos oxidativos generados por la criopreservación.

El Resveratrol (RES) es un derivado fenólico proveniente de las uvas, nueces y algunas bayas, y que es caracterizado por tener poderosas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. La suplementación de RES al medio de congelación de espermatozoides ha sido sugerida debido a que disminuye los efectos negativos del estrés oxidativo. Nouri *et al.*, (2018) en su estudio en equinos en el que usó 3 diferentes concentraciones de RES (5, 10, y 20 μM), comprobó que con 10 μM , este antioxidante puede ser un buen eliminador de radicales libres en el medio de congelación, mejorando la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana, actividad mitocondrial, y la fragmentación del ADN; los resultados obtenidos en este estudio son muy importantes ya que la adición de este antioxidante en diluyentes de congelación comercial, mejoran la capacidad de fertilización y el rendimiento reproductivo durante la IA con semen semental descongelado y congelado con problemas de baja fertilidad.

Basándonos en lo expuesto anteriormente, la presente investigación planteo la hipótesis de que la incorporación del RES a los procedimientos de congelación y vitrificación de espermatozoides equinos podría potenciar la resistencia a la criopreservación. Se prevé que esta mejora se refleje en un aumento de la motilidad, y preservación de la integridad de las membranas, así como una reducción del estrés oxidativo y la fragmentación del ADN.

Objetivos

a. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la suplementación de resveratrol en la criosupervivencia de espermatozoides equino congelados y vitrificados

b. Objetivo Especifico

- Valorar la cinemática e integridad de membranas de espermatozoides equinos congelados y vitrificados con resveratrol
- Valorar el estrés oxidativo e integridad de ADN de espermatozoides equinos congelados y vitrificados con resveratrol

Hipótesis

El uso de 10 μM de resveratrol como antioxidante y crioprotector del semen equino podría mejorar la viabilidad y la motilidad espermática, disminuyendo el estrés oxidativo durante la criopreservación, lo que podría resultar en una técnica de preservación de semen más eficaz y beneficiosa para la reproducción equina.

Revisión de literatura

2.1. Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, pudiendo almacenar células germinales por periodos largos de tiempo; no obstante, existen factores que afectan a las células y pueden resultar en daños subletales, y con una reducción de la función (Oliveira, 2013).

2.1.1. Métodos de criopreservación

Uno de los métodos que se han usado por años es la congelación lenta o convencional se realiza mediante vapores de N_2 . Mediante este método, las células se enfrían por debajo del punto de congelación, produciéndose la nucleación espontánea del hielo entre $-5^{\circ}C$ y $-15^{\circ}C$. A continuación, los cristales de hielo crecen rápidamente, dejando algunas celdas llamadas fracción no congelada, donde se encierran las células y los solutos (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2011).

La congelación convencional provoca daños estructurales y funcionales en los espermatozoides como consecuencia de la formación de cristales de hielo y desequilibrio osmótico (Mohamed Shehata Ali, 2015). Entre los daños más comunes están las alteraciones de la membrana plasmática, el daño mitocondrial, el deterioro de la integridad del ADN y las alteraciones del citoesqueleto, causando efectos negativos en la viabilidad y movilidad espermática (Sánchez *et al.*, 2015).

Una de las alternativas que se han propuesto para evitar la formación de cristales de hielo es otro método conocido como vitrificación, en donde la solución permanece sin cambios y el agua no precipita, por ende no se forman cristales de hielo (G M Fahy, 1986). La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas, no por cristalización de hielo, sino por una elevación extrema de la viscosidad durante el enfriamiento (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2015; Mohamed Shehata Ali, 2015). Este método es simple y rápido con una duración aproximada de 2 a 30 minutos, volviéndose más rentable que la congelación convencional, ya que no se requiere de un medio específico de criopreservación, y equipo especializado, reduciendo costos de producción, y con mejor rentabilidad (Slabbert *et al.*, 2015).

Los dos parámetros más importantes de la vitrificación son las tasas de enfriamiento y el calentamiento (Liebermann *et al.*, 2002). Es importante alcanzar un equilibrio entre la maximización de la velocidad de enfriamiento y la minimización de la concentración del crioprotector (Terreros C. *et al.*, 2015). Una de las principales estrategias de este método es pasar rápidamente a través de la zona de temperatura crítica de 15 a -5 °C para disminuir las lesiones por frío. Para revertir la vitrificación, el calentamiento se realiza a altas velocidades (Sánchez *et al.*, 2015). El uso de crioprotectores con una alta hidrosolubilidad y baja citotoxicidad disminuyen el punto de cristalización de solventes, y hacen que muchas células puedan sobrevivir al almacenamiento a bajas temperaturas (Restrepo Betancur *et al.*, 2012).

2.1.2. Crioprotectores (CPO): Concepto y funciones de los crioprotectores durante el proceso de congelación.

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que tienen como función la reducción de la velocidad a la que se llega a formar el hielo y el tamaño de los cristales (Prien, 2016). Además, favorece una mayor deshidratación de la célula espermática, disminuyendo el gradiente osmótico que es sometido dicha célula, por lo tanto, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura más baja quedando la célula más protegida (Ramónnez *et al.*, 2017).

Los crioprotectores se clasifican en sustancias permeables y no permeables.

2.1.2.1. Crioprotectores permeables (intracelulares)

Son moléculas pequeñas no iónicas que tienen alta solubilidad en agua, son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana plasmática (Squires, 2013). Estas sustancias producen una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas, ayudando a disminuir la formación de cristales de hielo intracelulares, incrementando la supervivencia espermática a la congelación y actuando en el medio intra y extracelular (Cruz & Jaramillo, 2016).

El glicerol es el más usado, y se ha señalado como el más eficaz para reducir la congelación del agua intracelular, y proporcionar ajustes de osmolalidad mediante protección térmica

invasiva (Prien, 2016). Este penetra la membrana celular por difusión pasiva, permaneciendo en la membrana y en el citoplasma (Le *et al.*, 2019). El movimiento del agua se produce más rápidamente y provoca la deshidratación de las células (Squires, 2013). Además, el glicerol cumple un efecto directo sobre la acción de la membrana celular ya que se une a los grupos de la cabeza de los fosfolípidos reduciendo la fluidez de la membrana (Alvarenga *et al.*, 2016).

El glicerol sirve como CPO líder para algunas especies; no obstante, puede presentar un efecto negativo como una reducción en la motilidad y fertilidad post- descongelación que ha sido descrito en equinos (Restrepo Betancur *et al.*, 2012). Además, presenta efectos tóxicos como alteraciones citoplasmáticas, provocando desnaturalización de proteínas (Oliveira, 2013). Estos efectos tóxicos esta desencadenado por el estrés osmótico, que se produce en la incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Prien, 2016). Si bien el glicerol proporciona una protección satisfactoria para un 20 % aproximadamente de los animales clasificados como buenos congeladores, ha demostrado ser perjudicial en un 80 % restante por su gran viscosidad y peso molecular (Sharafi *et al.*, 2022) ; además, se menciona que en las yeguas presenta un efecto anticonceptivo (Ramónnez *et al.*, 2017).

Todos estos problemas con la toxicidad del glicerol han llevado a realizar más investigaciones y pruebas de otros CPA penetrantes de menor toxicidad y con la capacidad de producir resultados comparables o incluso de mejor calidad (Sharafi *et al.*, 2022). Todo esto incluye combinaciones de CPA penetrantes, que pueden llegar a tener pesos moleculares más bajos, mayor solubilidad en agua y toxicidad mínima, mostrándose ventajoso para la criopreservación (Terreros C. *et al.*, 2015).

El dimetilsulfóxido es otro agente crioprotector que contiene un peso molecular de 78.13 g/mol y que permite atravesar la membrana celular de manera rápida, evitando la producción de cristales intracelulares al momento de la criopreservación celular (Alvarenga *et al.*, 2005; Squires *et al.*, 2004). Esta molécula contiene en su estructura azufre (S), lo que facilita atravesar las membranas celulares. Esta rápida capacidad de penetración es la que ayuda a disminuir la cantidad de tiempo para desplazar el agua del líquido intracelular al entorno extracelular (Gregory M Fahy, 2010). El uso de una pequeña cantidad de este

compuesto junto con el glicerol u otro CPA ayuda a estabilizar la célula antes de la congelación (Prien, 2016).

Los CPA derivados del grupo de las amidas han aumentado el potencial de congelación, son menos tóxicos y han demostrado tener menores resultados dañinos en comparación que el glicerol (Gregory M Fahy, 2010). Varias investigaciones han demostrado que la dimetilformamida (DMF) con un peso molecular de $73,1 \text{ g/mol}$ mejora la motilidad post-descongelación y preserva las membranas celulares (Giugliarelli *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2004).

La DMF y la metilformamida (MF) pueden llegar a penetrar los espermatozoides de una manera más eficiente, resultando una reducción de la hinchazón durante el periodo de equilibrio (Alvarenga *et al.*, 2005). Sin embargo, la DMF, y MF pueden ser las únicas con posibles efectos criogénicos (Prien, 2016) . A pesar de que no producen un aumento significativo en la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación, pueden aumentar la fertilidad del semen congelado-descongelado, siendo su uso muy eficaz (Medeiros *et al.*, 2002). El uso de DMSO y amidas pueden mejorar la viabilidad y motilidad post descongelación en relación con el GLY (Alvarenga *et al.*, 2005).

2.1.2.2. Crioprotectores no permeables (extracelulares)

Los crioprotectores no permeables son polímeros o azúcares de cadena larga, de elevado peso molecular que no pueden atravesar la membrana plasmática; por lo tanto, su efecto protector lo desarrollan en su medio extracelular por medio de mecanismos osmóticos, disminuyendo la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). El uso de la yema de huevo (YH) en la formulación de los diluyentes brinda un efecto crioprotector, principalmente por el contenido de sustancias presentes en la fracción plasmática, que inhiben la respiración de los espermatozoides, disminuyendo la motilidad (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2015). . La función de la YH durante el proceso de congelación y descongelación a través del contenido de fosfolípidos (lectina) y lipoproteínas que tienen baja densidad (LDL), es adherirse a la membrana celular durante la congelación para restaurar los fosfolípidos perdidos, y disminuir el choque térmico (Foulkes, 1977; Pace & Graham, 1974). Además, induce un cambio transitorio en la composición de los fosfolípidos

previniendo la ruptura de la membrana celular, protegiendo a los espermatozoides (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2015).

La concentración adecuada usada en los diluyentes depende de cada especie, pero generalmente es del 20% (Cruz & Jaramillo, 2016; Pineda González & Pinilla Arenas, 2007). La YH mediante centrifugación se separa en dos fracciones, plasma y gránulos. El plasma contiene el 85% de LDL y 15 % de livetina (Foulkes, 1977). Sin embargo, el uso de la YH puede también presentar ciertas desventajas ya que al ser un componente de origen animal representa un riesgo de contaminación de la dosis de inseminación artificial con bacterias, pudiendo llegar a ser una fuente de endotoxinas dañando el potencial de fertilidad de los espermatozoides (Pace & Graham, 1974).

Por otro lado, los azúcares actúan sobre la presión osmótica deshidratando las células, reduciendo la cantidad de agua intracelular disponible para la posible formación de hielo (Sieme *et al.*, 2015). Además, son una fuente de energía para los espermatozoides durante la incubación protegiendo la membrana plasmática durante la congelación y descongelación mediante la interacción directa con la membrana celular (Alvarenga *et al.*, 2016).

Dentro del grupo de los azúcares están la sacarosa (α -D-Glucopiranosil - (1 \rightarrow 2) - β -D-Fructofuranósido) y trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D- glucopiranosido; C₁₂H₂₂O₁₁; PM= 342.31). La sacarosa tiene la propiedad de interactuar con las membranas biológicas en temperaturas bajo cero y modifica la permeabilidad de manera similar a los agentes crioprotectores permeables, disminuyendo la formación de hielo extra e intracelular, protegiendo la membrana de los espermatozoides (Arando *et al.*, 2017). La concentración de la sacarosa para la crioconservación varía entre especies. En varios estudios se ha demostrado que se necesitan mayores concentraciones (100 mM) para optimizar la cinética del esperma, disminuyendo la motilidad de los espermatozoides, debido a la mayor viscosidad del medio (Sánchez *et al.*, 2011).

La trehalosa un disacárido que actúa como eliminador no enzimático a través de su efecto osmótico, induce sus efectos protectores contra el daño oxidativo desempeñando un papel en la protección de los espermatozoides contra las EROS (Liu *et al.*, 2016). Además, tiene

la capacidad de reducir el shock frío durante el almacenamiento en frío a 5 °C lo que demuestra su acción protectora extracelular, ayuda a disminuir las lesiones provocadas por los cristales de hielo y provoca deshidratación celular por su efecto hipertónico (Ahmad *et al.*, 2015). Una acción adicional es modular la fluidez de la membrana ya que se inserta en la bicapa de fosfolípidos y brinda estabilidad de la misma durante la congelación, lo que resulta en una mejor resistencia de los espermatozoides frente al daño durante la congelación, y descongelación, y mejora su viabilidad y motilidad (Luzko *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Requena, (2018) reportó, que los espermatozoides expuestos en medios a varias concentraciones (0,15M, 0,3M y 0,5M), de sacarosa y trehalosa resultó en una reducción significativa de la motilidad espermática en concentraciones más altas; no obstante, con las concentraciones más bajas se observó una mejor motilidad.

La leche desnatada contiene la fosfocaseínas, caseínas y beta lactoglobulinas, estas proporcionan los nutrientes necesarios para el metabolismo de los espermatozoides, funcionando como amortiguadores para el control adecuado de pH, y la osmolalidad, protegiendo la membrana plasmática contra el shock por frío y daño oxidativo (Alvarenga *et al.*, 2016). Dado que la leche desnatada no contiene lípidos, es tan eficaz como la leche entera para proteger el esperma durante el almacenamiento del semen a 48°C, o durante la criopreservación (Batellier *et al.*, 1997). Los lípidos no son los responsables de la protección que brinda la leche, ya que varios estudios demuestran que los componentes activos implicados en la protección de los espermatozoides son las micelas de caseína, que son las principales proteínas de la leche (Muñoz *et al.*, 2013).

Además, la adición de lactosa a los diluyentes que contienen caseínas, ayuda a mejorar la eficiencia durante la congelación; sin embargo, el filtrado de leche que solo contiene lactosa y minerales no es suficiente para proteger el esperma de semental durante el almacenamiento, por lo tanto, la lactosa ayuda solo mejorar la eficacia del diluyente, pero no es suficiente para proteger los espermatozoides por si solos (Bergeron & Manjunath, 2006).

2.1.3. Factores que determinan la crioresistencia espermática

En el periodo de congelación, los espermatozoides se enfrentan a una serie de daños letales y subletales que principalmente se evidencia una disminución en la fertilidad del

semen descongelado (Pérez *et al.*, 2017). Estos daños son provocados por cambios bruscos de temperatura y osmolaridad del medio. Puesto que, el descenso de temperaturas en la congelación, evitan la producción de cristales de hielo, formando así un daño celular del espermatozoide por el estrés osmótico y oxidativo (Watson, 2000). Por lo tanto, la calidad espermática del semen congelado depende específicamente de la eficiencia del espermatozoide al no perder sus principales funciones como la viabilidad, motilidad y entre otros, generando así shock osmótico, térmico y estrés oxidativo (Peña *et al.*, 2011).

El shock osmótico ocurre cuando existen dos situaciones que se vuelven críticas según avanza el proceso de congelación; el primero es cuando se diluyen en el medio de congelación, ya que es una solución hiperosmolar y cada vez que avanza el proceso, el agua del medio se congela, produciendo un aumento relativo de solutos, que aumenta aún más la osmolaridad del medio (Sandoval *et al.*, 2007). Por tal motivo, los espermatozoides se deshidratan produciéndose una disminución de su volumen. En cambio, en el procedimiento de la descongelación, se genera un shock hipoosmótico ya que el medio recupera su osmolaridad inicial y los espermatozoides se hinchan de nuevo (Macías García *et al.*, 2011). Entonces, estos diferentes cambios de volumen afectan negativamente a la integridad de la membrana y al citoesqueleto de la célula (Pérez *et al.*, 2017).

El shock térmico se trata de los cambios de temperatura que provocan una transición de fase en los lípidos, especialmente en los fosfolípidos que están en las membranas plasmáticas, el acrosoma y las mitocondrias, por lo que provoca principalmente cambios en la fluidez de las membranas y pérdida de su integridad y funcionalidad (Clulow *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo refiere a la producción de EROS o “radicales libres”. Estas son moléculas de tamaño pequeño con una capacidad de difusión e interacción (Bansal & Bilaspuri, 2011). Las EROS a bajas concentraciones desarrollan funciones fisiológicas como la capacitación o hiperactivación celular; en cambio, al producir una alteración en el equilibrio en los mecanismos específicos de degradación de EROS, se afecta la función de los espermatozoides, de la misma manera que ocurre durante la congelación donde la mayor parte del plasma seminal que contiene las enzimas antioxidantes se extrae (Carvajal, 2019).

2.1.4. Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen equino:

Los fosfatos tienen propiedades que ayudan a regular el pH, además actúan como quelantes de EROS con un fuerte efecto antioxidante contra la oxidación de lípidos por la unión a iones metálicos que actúan como catalizadores de oxidación, permitiendo la peroxidación lipídica (Kılıç *et al.*, 2015).

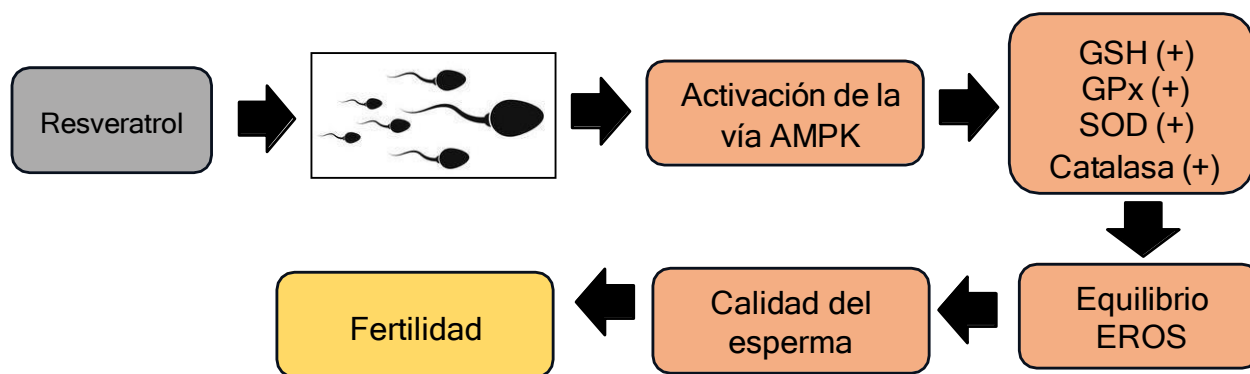
Los beta aminoácidos tienen funciones como antioxidantes, normalmente se encuentran en el semen y en otras partes del cuerpo para proteger a las células de los EROS (Ijaz & Ducharme, 1995). La beta aminoácido taurina ayuda a estimular la motilidad y reacción acrosómica en semen equino enfriado, no obstante, no hay investigaciones suficientes que demuestren lo mismo en semen equino congelado (Stephens *et al.*, 2013).

La pentoxifilina y cafeína son inhibidores de la fosfodiesterasa, bloquean la descomposición enzimática del AMPc, los niveles elevados de este AMPc hacen que se active el glucólisis produciendo ATP (Adenosin trifosfato) que se usa para expresar motilidad (Stephens *et al.*, 2013). Además, al diluir el semen con pentoxifilina o cafeína ayuda aumentar los niveles de ATP celular, dando así una motilidad más elevada (Rees *et al.*, 1990).

La seroalbumina bovina (BSA), por su parte tiene como objetivo reducir la variabilidad biológica y los problemas de bioseguridad inherentes al uso de la leche, además produce un diluyente con una coloración más clara mejorando las características del esperma de seminal después de la incubación (Gibb *et al.*, 2011). Este se absorbe en la superficie de la membrana plasmática del esperma brindando protección contra los efectos nocivos durante la conservación (Matsuoka *et al.*, 2006). Además, juega un papel importante en la eliminación del colesterol y zinc de los espermatozoides, reduciendo contenidos de esteroides en las células (Sariözkan *et al.*, 2009). Varios estudios demuestran que diluyente suplementado con BSA al 1% libre de ácidos grasos y bajo endotoxinas mejora la motilidad de los espermatozoides después del almacenamiento durante 18 horas en comparación con los de la leche descremada tradicional (Diaz-Jimenez *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2011). En otras especies desempeña un papel como antioxidante dando lugar a mejores tasas de fertilidad de los espermatozoides criopreservados (Naijian *et al.*, 2013).

Finalmente el resveratrol (RES: trans-3,5,40-trihidroxiestilbeno) es un polifenol no flavonoide aislado de las uvas rojas que tiene una actividad antioxidante, antiinflamatoria, cardioprotectores, quimiopreventivas y anti apoptóticas (Nouri *et al.*, 2018). En cuanto a las características fisicoquímicas es un polvo solido blanco con un peso molecular de 228,25g/mol, baja solubilidad en agua, un punto de fusión entre 253 y 255 C, fotosensibilidad al pH, y la presencia de isómeros Trans y Cis, siendo el isómero trans el estérico preferido (Restrepo, Varela, *et al.*, 2019). El RES como antioxidante está relacionado con la alta propiedad redox de los grupos hidroxilo fenólicos, que actúan como eliminadores de radicales libres, este activa muchas enzimas antioxidantes como la catalasa y el superóxido dismutasa, inhibiendo los LPO y regulando la expresión de cofactores y enzimas antioxidantes (Chi *et al.*, 2008).

Al momento de la congelación de los espermatozoides se eliminan fuentes ricas de antioxidantes del semen, es por eso que se ha empezado a usar antioxidantes en medios de cultivo para proteger a los espermatozoides de esos efectos destructivos de las EROS (Bansal & Bilaspuri, 2011). El RES que tiene una estructura análoga al estradiol, y se asocia con el metabolismo y la producción de energía. Este ayuda a mejorar la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) produciendo una reducción de la tasa de apoptosis de EROS y ADN al preservar el potencial de la membrana mitocondrial seguido de la congelación del semen (Juan *et al.*, 2005). Por lo tanto, según el efecto del RES sobre la AMPK y la presenciade AMPK en todo el flagelo y en la región post-ecuatorial de la cabeza, el RES tiene un papel principal en la motilidad de los espermatozoides (Shabani Nashtaei *et al.*, 2017).



Fuente: Adaptado de Pasquariello *et al.*, (2020)

Figura 1: Mecanismo del RES

El RES activa la vía AMPK, que se relaciona con la función mitocondrial y una mayor actividad del glutatión, el glutatión peroxidasa, el superóxido dismutasa y la catalasa que determinaran el equilibrio de EROS. Todo esto ayuda a proteger contra el estrés oxidativo, y así se mejora la calidad del esperma, y, por ende, la fertilidad de los espermatozoides (Pasquariello *et al.*, 2020).

En un estudio realizado por Nouri *et al.*, (2018) se evaluó la efectividad del resveratrol en la cual se compararon tres concentraciones diferentes 5, 10, 20 μM de RES, dando como resultado que la suplementación con 10 μM de resveratrol mejoró la motilidad total y progresiva y la viabilidad, teniendo un efecto positivo sobre la integridad de la membrana posterior a la descongelación y el daño del ADN. A diferencia de que cuando se usaba los 5 μM no hubo diferencias significativas con El tratamiento control, y cuando se usó 20 μM mostraron un efecto negativo sobre la motilidad total (He *et al.*, 2020). Estos resultados nos indica que el resveratrol aumenta significativamente la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP, y el potencial de membrana mitocondrial, y disminuye los EROS (Pasquariello *et al.*, 2020).

Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales físicos

- Refrigerador (Haceb, NEV AS 388L, México)
- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste defase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Microscopio de contraste de fases (Olympus, CX31RBSFA, Tokio Japon)
- Cámara de Neubauer (MARIENFELD, Alemania)
- Estufa (Mettler, Alemania)
- Máquina de calentamiento STC 500 (Fabricación manual)
- Baño María (Mettler, WNB 10 LITROS, Alemania)
- Microcentrífuga (PCL-01 series, K centrifuge ,Taipei Taiwan)
- Platina térmica (Ref: 12055, Minitube, Alemania)
- Pajuelas de 0,5 mL (IMV, L'Aigle Cedex, Francia)
- Vagina artificial (Ref: 11221/0000, Minutube, Alemania)
- Pipetas automáticas (BOECO, BOE 9610220, Alemania)
- Criotubos (Wuxi NEST Biotechnology, Jiangsu, China)
- Tubos Falcon de 15 mL Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Papel aluminio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Vasos de precipitación de 20 y 100 mL (GLASSCO, GL-229.402.02)
- Termómetro digital (WMETER, TP101, China)
- Caja criogénica de poliestireno con dos rampas de congelamiento.
- Liners de colecta

3.1.2. Materiales biológicos

- Eyaculados de cuatro sementales equinos
- Agua bidestilada

3.1.3. Reactivos

- Botusemen-Special® (Ref: 550/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- Botusemen-Gold® (Ref: 008/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- N, N-Dimethylformamide (D119-4, LOT 205730, Fisher chemical)
- Trehalosa (24900594, Sigma - Aldrich)
- BSA (A311-10G, Sigma - Aldrich)
- Resveratrol (R5010, Sigma - Aldrich)
- Alcohol polivinílico (P-8136, Sigma - Aldrich)
- Hepes Salt, (NaCl, KOH, glucosa, agua destilada)
- Yoduro de propidio (PI, P4170, Sigma - Aldrich)
- Aglutinina (PNA-FITC, L7381, Sigma - Aldrich)
- CellROX Deep Red Reagent fluorescent probe (Ref: 10422, Life Technologies)
- TALP Stock medium (113,94 mM NaCl, 3,08 mM KCl, 0,30mM NaH₂PO₄ H₂O, 1mM Na-Lactate, 1,97mM CaCl 2H₂O,0,50mM MgCl 6H₂O, 10mM HEPES sodium, and 25mM NaHCO₃; 320 mOsm/Kg, pH 7,3)
- Nitrógeno líquido

3.2. Métodos

3.2.1. Área de estudio

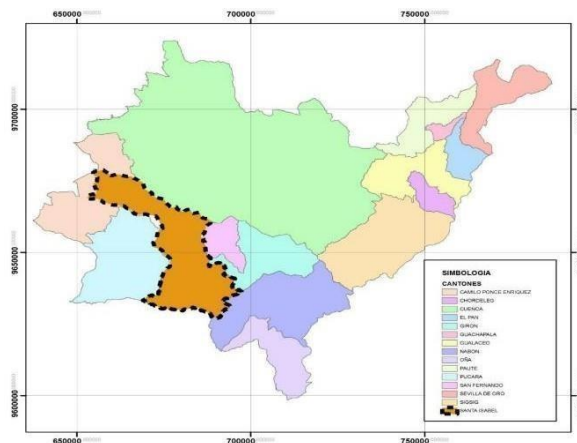


Figura 2: Ubicación geográfica del área de estudio

La recolección de semen equino se realizó en la hacienda El Carmen ubicado en el valle de Yunguilla que se encuentra en el cantón Santa Isabel perteneciente a la provincia de Azuay (PPXW+742, Lentag). La Hacienda el Carmen se ubica de 1500 a 3150 metros de altura sobre el nivel del mar, con una temperatura de 18° C.

El procesamiento, congelación y análisis de las muestras frescas y descongeladas se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicada en la granja Irquis (Latitud. -3.0801834; Longitud: -79.0753254) la cual se encuentra en el km 23 de la vía Cuenca- Girón-Pasaje, perteneciente a la parroquia Victoria del Portete, a 2663 msnm, y un clima templado frío con una temperatura promedio de 8°C.

3.2.2. Elaboración de diluyentes y medios

Los diluyentes fueron realizados en base a las recomendaciones de sus casas comerciales:

Tabla 1:Diluyente Botusemen Gold

Reactivo	Cantidad
Botusemen-Gold®	8,5 g
Agua purificada	100ml

Se almacenó en alícuotas de 50 µL y se congeló a -20 °C.

Tabla 2: Diluyente Botusemen special

Reactivo	Cantidad
Botusemen-Special®	8,5 g
Agua purificada	100ml

Se almacenó en alícuotas de 50 μ L y se congeló a -20 °C.

En las siguientes tablas se detallan los reactivos que se ocuparon con las que se elaboraron las tinciones.

Tabla 3: Medio de HEPES para fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes Salt	476,62 mg
Cloruro de sodio	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua destilada	100 ml

Se almacenó en alícuotas en 250 μ L en tubos eppendorf y se congeló a -20 °C.

Tabla 4: Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 mL

Se almacenó en alícuotas de 50 μ L y se congeló a -20 °C.

Tabla 5: Aglutinina

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

Se almacenó en alícuotas de 50 μ L y se congeló a -20 °C.

Tabla 6:TALP

Reactivo	Cantidad
NaCl	113,94 mM
KCl	3,08 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,30mM
CaCl ₂ H ₂ O	1,97mM
Na-Lactate	1Mm
MgCl ₆ H ₂ O	0,50mM
HEPES sodium	10mM
NaHCO ₃	25mM

Se almacenó en alícuotas de 50 µL y se congeló a -20 °C

Tabla 7: PBS

Composición	Cantidad	Cantidad
Solución A	mM	g/L (10x)
NaCL	136,89	80,0
KCl	2,68	2,0
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	8,09	29,0
KH ₂ PO ₄	1,47	2
Solución B	mM	g x100 ml (10x)
CaCl ₂ H ₂ O	0,457	0,67
MgCl ₆ H ₂ O	0,492	1,0

Esterilizar las soluciones A y B separadamente, luego tomar 100 ml de la solución A y 10 ml de la solución B, y 890 ml de agua para preparar 1000 ml de PBS

3.2.3. Diseño experimental

En este experimento se evaluó el efecto antioxidante y crioprotector del Resveratrol en dos protocolos de criopreservación, la congelación convencional y la vitrificación, sobre la supervivencia de espermatozoides equinos. Para este propósito se recolectaron un total de 16 eyaculados de semen provenientes de 4 caballos españoles adultos, fértiles y clínicamente sanos. A cada caballo se le recolectó un eyaculado por semana usando una vagina artificial (Minutube, Alemania) durante 4 semanas. Cada eyaculado fue diluido

inicialmente 1:1 con Botusemen-Special® (Botu/Special, BotuPharma, Brasil) y fue transportado al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca en un tiempo aproximado de 60 minutos. El semen diluido fue centrifugado a 400 gravedades durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido con el diluyente Botusemen-Gold® (Botu/Special, BotuPharma, Brasil) a una concentración inicial de 100×10^6 esp/ml. Con esta dilución base se realizó cuatro tratamientos según el tipo de criopreservación (Congelación y vitrificación) y el tratamiento con RES (RES y control):

- Tratamiento 1 (C-RES): Congelación convencional con 10 μ M de RES
- Tratamiento 2 (C-Co): Congelación convencional control
- Tratamiento 3 (V-RES): Vitrificación cinética con 10 μ M de RES
- Tratamiento 4 (V-Co): Vitrificación cinética control

3.2.4. Reproductores y recolección de semen

La recolección del semen se realizó en cuatro caballos reproductores de la raza española de 7 a 16 años de edad clínicamente sanos, con una condición corporal normal de 7/10, ejercitados, con un protocolo de desparasitación cada 3 meses conjunto con vitaminas, y minerales, sexualmente maduros, con un manejo de monta, en cuerda y en aire libre. Su alimentación es a base de balanceado (Derby mantenimiento), en horario de tres veces al día, y entre comidas un tercio de paca de alfalfa o avena. La colecta del semen se hizo mediante vagina artificial a una temperatura entre 40-47 °C. Antes de la colecta se exteriorizó y limpió el pene con agua tibia (a 37 °C).

Posterior a esto, se procedió a la recolección del semen, sin producir estrés al animal. Inmediatamente después de la recolección cada eyaculado fue pre-diluido en una proporción 1:1, con el diluyente Botusemen-Special® atemperado a 37°C. Luego de esto las muestras fueron transportadas a una temperatura de 22 °C hasta el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal, en un tiempo máximo de 1 hora, para su evaluación inicial y posterior procesamiento.

3.2.5. Criopreservación de muestras

Una vez que las muestras frescas y diluidas llegaron al laboratorio, fueron analizadas para determinar la motilidad total y el score (progresividad en escala del 1 al 5; 1 sin movimiento, 5 progresivo rectilíneo y rápido).

3.2.5.1. Congelación convencional

Para la congelación convencional (C-Co; C-RES), el semen se ajustó a una concentración final de 50×10^6 esp/ml usando el diluyente Botusemen-Gold® suplementado con dimetilformamida (DMF) al 5% y $10 \mu\text{M}$ (C-RES) o 0 (C-Co) mM de RES. Las muestras de cada grupo experimental se refrigeraron durante 2 horas, luego se cargaron manualmente en pajuelas de 0,5 ml y se sellaron con alcohol polivinílico (P-8136, Sigma). Las pajuelas se congelaron utilizando un protocolo de congelación según lo detallado por Tamay et al. (2022) que incluyó una caja criogénica de poliestireno con NL_2 , y dos rampas internas a diferentes distancias. Se colocó las pajuelas en la primera rampa a 17 cm por encima de la superficie del NL_2 durante 4 minutos y luego en una segunda rampa inferior durante 2 minutos a 7 cm por encima del NL_2 . El descenso de las pajuelas desde la primera a la segunda rampa se realizó rápidamente usando una pinza pre-enfriada. Finalmente, las pajuelas se sumergieron en NL_2 , y se almacenaron en portagoblets en los tanques de NL_2 , y se mantuvieron durante 1 mes. Se congelaron un total de 80 pajuelas (5 pajuelas por eyaculado; 20 pajuelas / caballo).

La descongelación de pajuelas se realizó sumergiendo las pajuelas en baño maría a 37°C durante 30 segundos. El contenido se vertió en tubos Eppendorf de 1,5 ml, y posterior a esto se realizaron los análisis respectivos.

3.2.5.2. Vitrificación de muestras

Para la vitrificación, el semen se ajustó a una concentración final de 50×10^6 esp/ml usando el diluyente Botusemen-Gold® suplementado con 1% de BSA, 100 mM de trehalosa y $10 \mu\text{M}$ (C-RES) o 0 (C-Co) mM de RES. Después del enfriamiento de 1 hora, el semen con el medio de vitrificación se dejó caer libremente sobre el NL_2 en gotas de $30 \mu\text{l}$ a una altura de 15 cm, y los pellets formados se almacenaron en criotubos (Wuxi NEST Biotechnology, Jiangsu, China) de 2 ml. Se vitrificaron en un total de 32 criotubos (2 criotubos / eyaculado; 8 criotubos / caballo).

El calentamiento se realizó en un dispositivo de calentamiento STC-3008 ajustado a una temperatura de 65 °C. Los pellets se dejaron caer en las platinas térmicas durante 3 segundos y el contenido se recogió en un vaso de precipitación de 20 mL. Las muestras espermáticas se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos e inmediatamente se resuspendieron en el diluyente Botusemen-Special para los análisis de calidad espermática.

3.2.6. Evaluación de la cinemática e integridad de membranas espermáticas

Las cinemáticas de las muestras espermáticas frescas y post-criopreservación (C-RES, C-Co, V-RES y V-Co) se analizaron objetivamente utilizando un sistema computarizado CASA-SCA® (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0.99 software. Microptic S.L., Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse modelo 50i; contraste negativo).

Para ello, posterior a la descongelación y calentamiento se colocó una alícuota de 5 µL de cada muestra en portaobjetos calentados a 37 °C y cubiertos con un cubreobjetos. Se evaluaron un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides (velocidad de adquisición de imágenes 25 fotogramas/s). Se registraron los siguientes parámetros: motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad promedio (VAP, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm), y frecuencia de batida del flagelo (Hz) según lo descrito por (Tamay et al., 2022).

La evaluación del estado de las membranas plasmática y acrosomal se usó la doble tinción fluorescente simultánea con yoduro de propidio y aglutinina "PI-PNA-FITC". Cada muestra de los diferentes grupos experimentales se colocó en 200 µL de HEPES a una concentración promedio de 20×10^6 esp/mL y en condiciones de oscuridad se adicionó una mezcla (5 µL) de yoduro de propidio (PI, Sigma P4170) y FITC/PNA aglutinina (*Arachis hypogaea*, PNA-FITC, Sigma L7381). Se colocó 5 µL de la muestra en un portaobjetos. Se examinó un total de 100 espermatozoides por portaobjetos utilizando un microscopio óptico de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. New York, NY, USA) con un filtro de paso de triple banda (40 x aumentos con una excitación: 450 - 490 nm, y emisión: 520 nm) y se clasificaron en cuatro categorías: 1) membrana plasmática intacta/acrosoma intacto (IPIA, %); 2) membrana plasmática intacta/acrosoma dañado (IPDA, %); 3)

membrana plasmática dañada/acrosoma intacto (DPIA, %); y 4) membrana plasmática dañada/acrosoma dañado (DPDA, %). Además, se calculó el porcentaje de integridad total de las membranas plasmáticas (Total IP: IPIA + IPDA) y acrosómicas (Total IA: IPIA + DPIA).

3.2.7. Evaluación del estrés oxidativo

El estrés oxidativo se evaluó utilizando la sonda fluorescente CellROX Deep Red Reagent® (2,5 mM; CAT 10422 Life Technologies, NY, USA) diluida en DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para una concentración final de 1mM (75µl de DMSO en 50 µl de CellROX) según lo detallado por Tamay et al. (2002). Este análisis se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia (modelo Eclipse Ci. L 100 -240V, Nikon, Tokio, Japón) con un aumento de 40X utilizando una combinación de tres filtros: B-2A (excitación 450-490 nm y emisión 520 nm), G-2A (excitación 510-560 nm y emisión 590 nm), y UV-2E/C 2A (excitación 330-380 nm y emisión 420 nm). Se añadió una alícuota de 200 µL (20×10^6 espermatozoides/mL) de cada muestra de espermatozoides, 0,5 µL de CellROX (1 mM) y 2 µL de Hoescht 33342 [diluido en PBS a una concentración de 1mg/ml (p/v)] y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación, cada muestra se centrifugó durante 5 min a 2000 g, y se eliminó el sobrenadante; el precipitado se resuspendió en 200 µL de medio Buffer fosfato salino (PBS). Para evaluar los espermatozoides con presencia de EROS, se colocó una alícuota de 5 µL de cada muestra en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos. En cada muestra se contaron 200 células y se clasificaron según su grado de estrés oxidativo en: (1) Espermatozoides sin estrés oxidativo. - Pieza intermedia y cola sin tinción; (2) Espermatozoides con estrés oxidativo moderado. - Pieza intermedia y cola teñida de rojo pálido; y (3) Espermatozoides con estrés oxidativo intenso. - Pieza intermedia y cola teñida de rojo intenso.

3.2.8. Evaluación de fragmentación de ADN

La fragmentación 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. Para ello, se tomó 10 µL de las muestras criopreservadas y se realizó un frotis en un portaobjetos. Las muestras espermáticas de cada grupo experimental 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 (90%), y ácido acético glacial (99,7 %) 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 favorecer la estabilidad de la cromatina. Posteriormente, las muestras fueron teñidas 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 [(modelo Eclipse Ci. L 100 -240V, Nikon, Tokio, Japón) (excitación: de 490/530 nm)]. Se analizaron cien 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.

3.2.9. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados en el software STATISTICA v.12. Las variables serán sometidas a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar una distribución normal; aquellas variables porcentuales y numéricas que no siguieron una distribución normal fueron transformadas a Arcoseno o Log-10, respectivamente previo a los análisis estadísticos. Un ANOVA factorial de 2 x 2 y la prueba de posHoc de Boferroni fueron usadas para comparar los dos métodos de criopreservación, congelación y vitrificación y dos tratamientos, Resveratrol y control sobre la cinemática, integridad de membranas y estrés oxidativo. Además, se incluyó al “caballo” como covariable por la posible variación entre los reproductores. El nivel de significancia fue considerado como $P < 0,05$.

Resultados

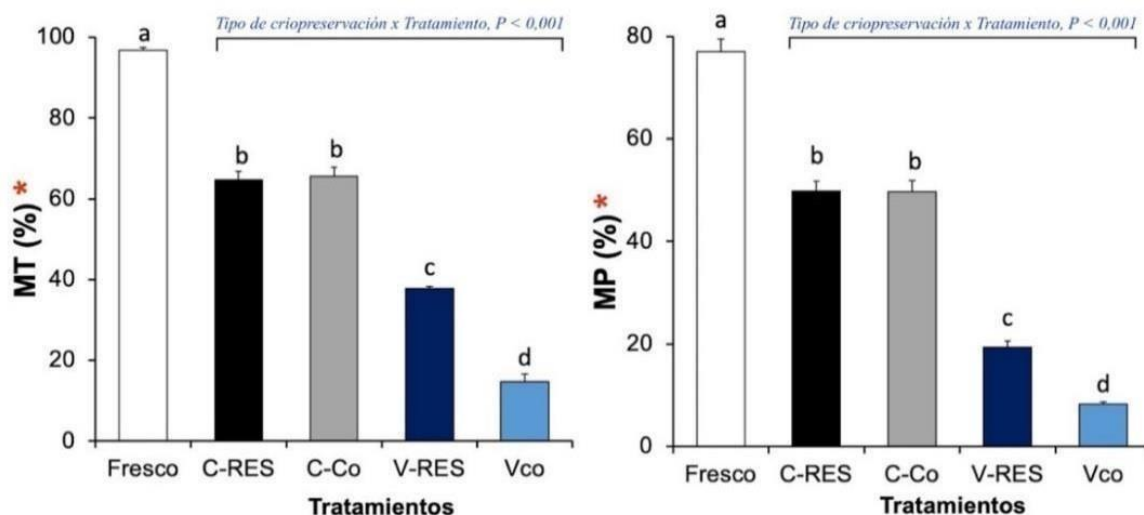
4.1. Cinemática

El análisis de la cinemática evidenció una interacción significativa entre el tipo de criopreservación y tratamiento ($P < 0,05$ y $P < 0,001$) en las motilidades (MT y MP), velocidades (VCL y VSL) y parámetros de relación de progresión (STR, LIN y WOB). Por otro lado, al incluir el factor “reproductor” se evidenció diferencias significativas entre caballos en las motilidades, VSL, parámetros de relación de progresión y BCF (Ver Figuras 3 – 6).

Los parámetros cinéticos tales como la MT, MP, VCL, VCL-RAP, VSL, VSL-RAP y ALH se vieron afectados por la criopreservación, independientemente del tipo (congelación o vitrificación) y la adición del RES, debido a que sus valores se redujeron ($P < 0,05$) después de los procesos criogénicos en comparación con sus valores en fresco.

Los tratamientos de congelación (C-Res y C-Co) produjeron mayores porcentajes de MT y MP que aquellos tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co). En la vitrificación, no obstante, se evidenció un efecto crioprotector del RES al producir mayores porcentajes de MT y MP con el tratamiento V-RES en comparación con el tratamiento control V-Co (Figura 3).

Figura 3: Porcentajes total de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides



frescos y criopreservados mediante congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol. * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$).

Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y motilidades a - b - c - d, $P < 0,05$; a - c, a - d, b - d, $P < 0,01$.

El análisis de las velocidades demostró que los tratamientos de congelación (C-Res y C-Co) produjeron una mayor VCL que el tratamiento V-RES. Sin embargo, no se evidenció diferencias significativas entre tratamientos el análisis de la VCL-RAP. Por otro lado, los tratamientos de congelación produjeron menores valores ($P < 0,05$) de VSL y VSL-RAP comparado con los tratamientos de vitrificación (Figura 4).

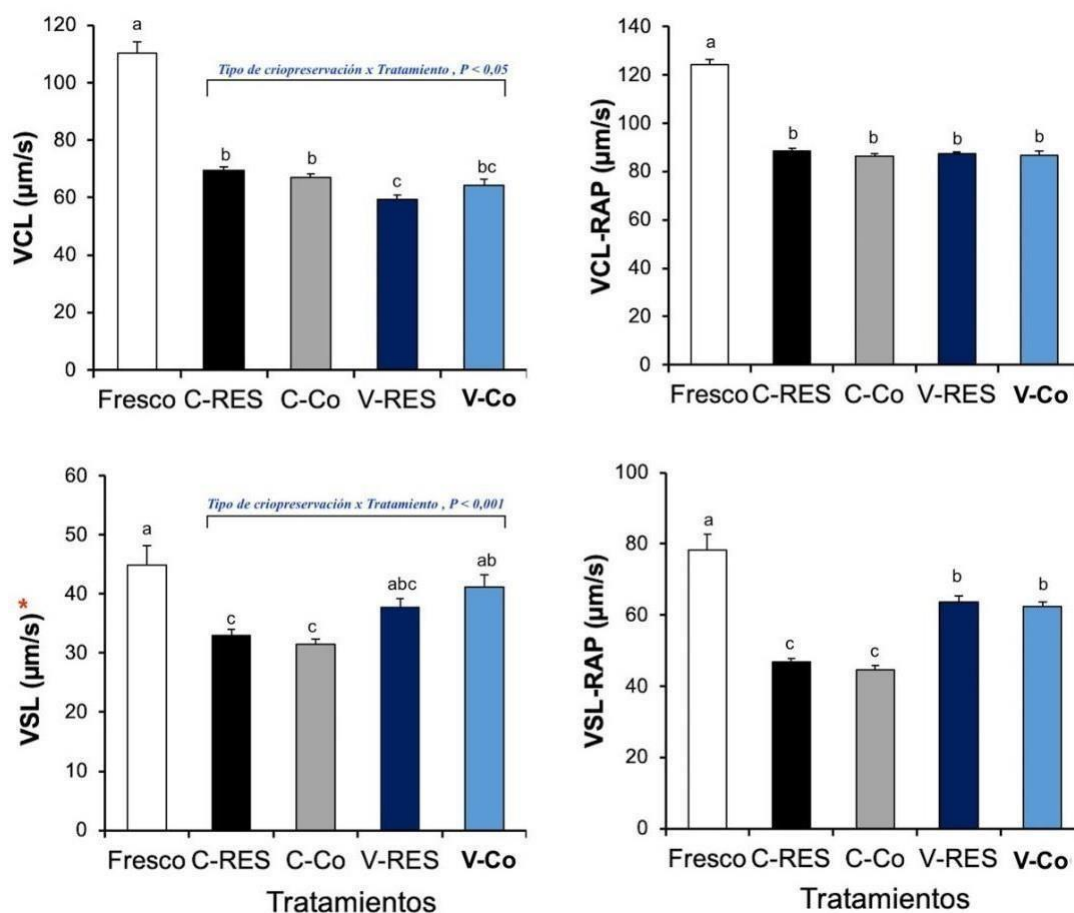
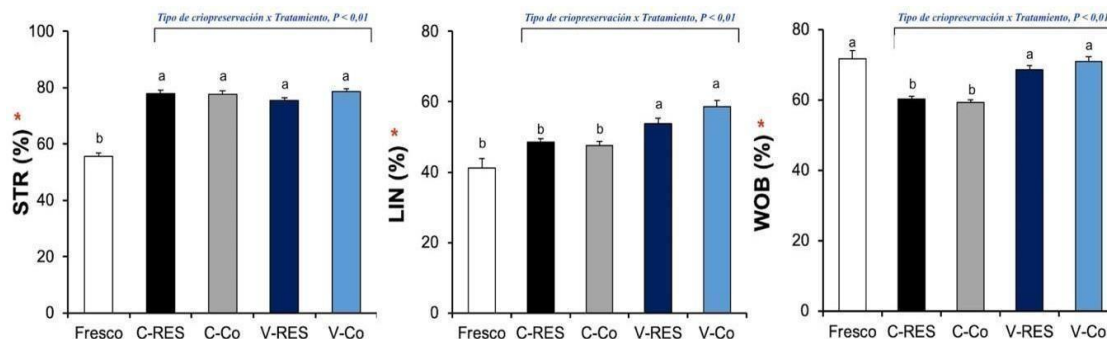


Figura 4: Velocidades curvilíneas (VCL) y rectilíneas (VSL) junto con sus trayectorias rápidas progresivas (VCL-RAP y VSL-RAP) de espermatozoides de caballo diluidos con Resveratrol (RES) y criopreservados por congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]). * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$). Letras

diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y velocidades, a - b - c, $P < 0,05$; a - c, $P < 0,01$

En el análisis de los parámetros de relación de progresión, los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron mayores porcentajes de espermatozoides con linealidad (LIN) y oscilación (WOB) que aquellos tratamientos de congelación (C-RES y C-Co) (Figura 5).

Figura 5: Rectitud (STR), Linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides frescos



y criopreservados mediante congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol. * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y parámetros, a - b - c - d, $P < 0,05$; a - c, a - d, b - d, $P < 0,01$.

Finalmente, los valores de ALH y BCF fueron más altos ($P < 0,05$) con los tratamientos de congelación frente a los de vitrificación, independientemente de la adición de RES (Figura 6).

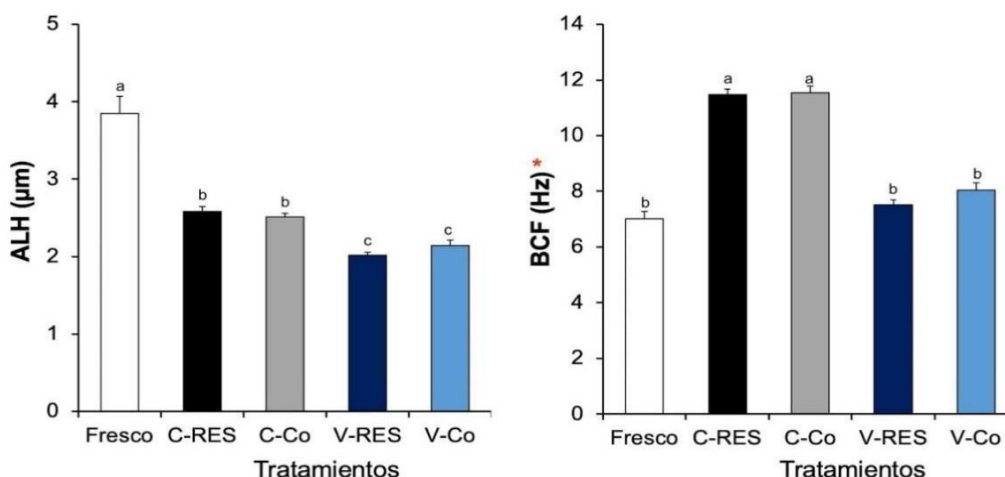


Figura 6: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de caballo frescos y criopreservados mediante congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol. * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y variables a – b – c – d, $P < 0,05$; a – c, a – d, b – d, $P < 0,01$.

4.2. Integridad de membranas

En el análisis del estado de las membranas plasmática y acrosómica se evidenció una interacción significativa ($P < 0,01$) entre el tipo de criopreservación y tratamiento en las categorías IPIA, DPDA y total IP. Además, al incluir el factor “reproductor” se evidenció diferencias significativas entre caballos en las categorías IPIA, DPIA, DPDA, Total IP y Total IA (Ver Tabla 8).

Los tratamientos de congelación (C-RES y C-Co) produjeron mayores porcentajes ($P < 0,05$) de IPIA y Total IP que aquellos tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co). Sin embargo, en la vitrificación, al igual que las motilidades, se evidenció un efecto crioprotector del RES, al demostrar que el tratamiento V-RES produjo porcentajes más altos de IPIA y Total IP en comparación con su control C-Co. En este mismo sentido, los tratamientos de congelación produjeron menores porcentajes ($P < 0,05$) indeseables de espermatozoides con la membrana plasmática dañada y acrosoma íntegro (DPIA) que los tratamientos de vitrificación. Asimismo, en la vitrificación, el tratamiento V-RES produjo un menor porcentaje

($P < 0,05$) indeseable de DPIA que su contraparte control C-Co. En la categoría indeseable DPDA de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal dañadas, el tratamiento C-RES produjo un menor porcentaje ($P < 0,05$) que el tratamiento V-Co. Finalmente, el tratamiento C-RES produjo un mayor porcentaje de espermatozoides con total integridad del acrosoma que los tratamientos de vitrificación (V-Res y V-Co) (Tabla 8).

Tabla 8 8: Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia (prueba PI / PNA-FITC) de espermatozoides de caballo diluidos con Resveratrol (RES) y entonces congelados (C-RES y C-Co [control]) y vitrificados (V-RES y V-Co [control]).

Categorías de Fluorescencia	Tratamientos			
	C-RES (n = 48)	C-Co (n = 48)	V-RES (n = 45)	V-Co (n = 48)
IPDA (%) [*] (A x B)	61,9 ± 1,32 ^a	56,6 ± 1,77 ^a	47,9 ± 1,67 ^b	25,7 ± 1,49 ^c
IPDA (%)	0,65 ± 0,09	0,79 ± 0,18	0,56 ± 0,09	0,44 ± 0,15
DPIA (%) [*] (A x B)	21,0 ± 0,80 ^c	21,9 ± 1,19 ^c	30,0 ± 2,05 ^b	49,3 ± 2,50 ^a
DPDA (%) [*]	17,1 ± 1,02 ^b	20,6 ± 1,35 ^{ab}	21,7 ± 0,99 ^{ab}	24,5 ± 1,57 ^a
Total IP (%) [*] (A x B)	62,5 ± 1,32 ^a	57,4 ± 1,79 ^a	48,4 ± 1,65 ^b	26,1 ± 1,53 ^c
Total IA (%) [*]	82,8 ± 1,07 ^a	78,5 ± 1,34 ^{ab}	77,8 ± 0,98 ^b	75,0 ± 1,60 ^b

Letras diferentes en cada fila difieren significativamente entre tratamientos ^{a-b-c}, $P < 0,05$. Asterisco representa diferencias significativas entre caballos ^{*} $P < 0,05$. (A x B) Interacción significativa entre tipo de criopreservación (A) y tratamiento (B), (A x B) $P < 0,01$.

4.1. Fragmentación de ADN

En el análisis de espermatozoides con el ADN fragmentado (cromatina condensada) se evidenció que los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron menores porcentajes ($P < 0,05$) que el tratamiento de congelación control C-Co. Es importante señalar que al incluir el factor “reproductor” se evidenció diferencias significativas ($P < 0,05$) entre caballos (Figura 7).

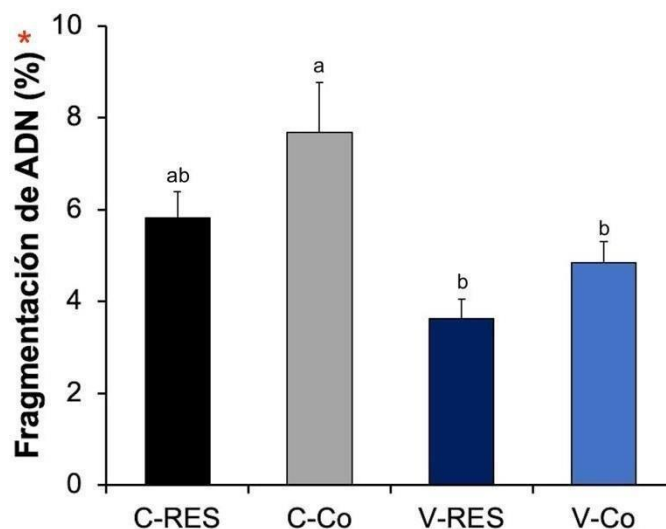


Figura 7:

Fragmentación de espermatozoides de caballo criopreservados mediante congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol. * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y motilidades a - b, $P < 0,05$.

4.1. Estrés oxidativo

En el análisis del estrés oxidativo (EO) y sus categorías (moderado e intenso) se evidenció una interacción significativa ($P < 0,05$) entre el tipo de criopreservación y tratamiento ($P < 0,01$) y un efecto significativo del reproductor ($P < 0,05$) en las categorías EO intenso y EO total (Figura 8).

El análisis del EO moderado demostró que los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co) produjeron menores porcentajes ($P < 0,05$) de EO moderado en comparación con el tratamiento de congelación control C-Co. Sin embargo, en el EO intenso, el tratamiento C-Co produjo un mayor porcentaje ($P < 0,05$) frente al tratamiento V-Co. De la misma manera,

los tratamientos de vitrificación produjeron menos porcentajes de EO total que el tratamiento C-Co. No obstante, en la congelación se evidenció un efecto antioxidante del RES al producir menores porcentajes de EO total con el tratamiento C-RES frente a su contraparte control C-Co (Figura 8).

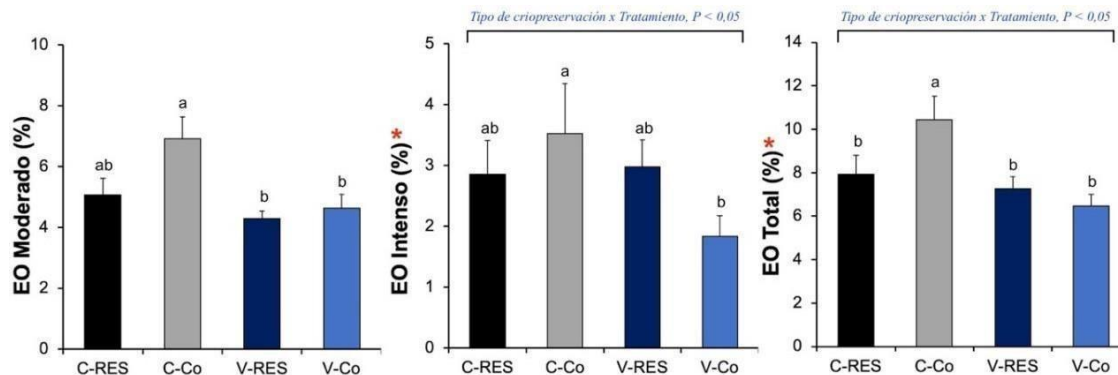


Figura 8: Estrés oxidativo (EO, %) moderado, intenso y total de espermatozoides de caballo criopreservados mediante congelación (C-RES y C-Co [control]) y vitrificación (V-RES y V-Co [control]) con Resveratrol. * Diferencias significativas entre caballos ($P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos y motilidades a - b, $P < 0,05$

Discusión

Los resultados de esta investigación demostraron que, en general, la congelación convencional produjo una mejor criorespuesta que la vitrificación, independientemente de la adición del RES. No obstante, la vitrificación produjo mayores valores de velocidad rectilínea, oscilación y linealidad, junto con menores valores de fragmentación de ADN que la congelación convencional. Esto hace atractiva a la técnica de vitrificación. Por otro lado, el efecto de RES fue evidenciado en la congelación únicamente en la disminución del estrés oxidativo; mientras que en la vitrificación el RES produjo una mayor motilidad total y progresiva y mayor integridad de las membranas plasmática y acrosomal. También, se observó una interacción entre el tipo de criopreservación y la adición RES, dado que la congelación convencional (C-RES y C-Co), obtuvo mejores porcentajes de MT y MP, integridad de membranas (IPIA y Total IP) que los tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co). La V-RES mostro ser significativamente mayor que la V-Co, evidenciando un efecto crioprotector del RES sobre la cinemática y la integridad de membranas en muestras vitrificadas. Además, las muestras vitrificadas suplementadas con RES (V-RES) produjo un menor porcentaje indeseable de DPIA que el control (V-Co). De la misma manera se evidenció menores porcentajes en la vitrificación (V-RES y V-Co) a comparación que la congelación control (C-Co). Por otra parte, el estrés oxidativo, mostró que la vitrificación produjo menores porcentajes de EO total que el C-Co. Aunque, en la congelación se evidenció un efecto antioxidante del RES al producir menores porcentajes de EO total con la C-RES frente a su control (C-Co). Mientras que, en la fragmentación del ADN se vio que el método de vitrificación produjo menores porcentajes que el método de congelación.

El éxito de la congelación de semen equino se ha asociado directamente con el efecto individual de la raza sobre la criotolerancia espermática y con la disminución del número de alteraciones que afectan la MT, MP, VCL, linealidad, permeabilidad de la membrana plasmática, morfología, fragmentación del ADN, peroxidación lipídica e incluso actividad mitocondrial del esperma (Restrepo, Varela, *et al.*, 2019). Sin embargo; el método de congelación convencional con vapores de nitrógeno líquido tiene un efecto sobre la integridad de las membranas y la motilidad del esperma equino (Restrepo, Varela, *et al.*, 2019). En cambio, la vitrificación es considerada una de las técnicas más usadas para preservación de ovocitos y embriones bovinos (Le *et al.*, 2019), pero representa una alternativa para la crioconservación del esperma equino, a pesar de que ha mostrado una

baja capacidad para preservar la motilidad y una reducción significativa de la viabilidad y la integridad acrosómica, ya que los espermatozoides de equino son más sensibles al daño osmótico (Restrepo, Varela, *et al.*, 2019). Según Castex & Miragaya, (2015) en los equinos esta técnica ha mostrado un bajo porcentaje en las variables de motilidad, viabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Estos hallazgos son similares a nuestro estudio, ya que en el tratamiento V-Co obtuvo los porcentajes más bajos (14,78804 % - 8,26294 %) de MT y MP en comparación con los demás tratamientos; no obstante, mediante esta misma técnica de criopreservación con la suplementación de RES, el porcentaje de MT y MP incremento significativamente (37,83471% - 19,38586 %). A pesar de esto, en nuestra investigación se obtuvieron mejores resultados en los parámetros cinéticos (MT, y MP) con los tratamientos de congelación (C-Res y C-Co) que aquellos tratamientos de vitrificación (V-RES y V-Co), similar a los resultados reportados por Aristegui Ibarra *et al.*, (2017). En dicho estudio realizado en espermatozoides de chivo el porcentaje de espermatozoides motiles (53,5 %) resulto significativamente mayor después de la congelación convencional en comparación con la vitrificación (46,8 %).

Estos resultados favorables en las variables cinemáticas de la congelación convencional en comparación con la vitrificación podrían ser explicados debido a las diferencias en la velocidad de enfriamiento, considerando que congelación lenta es menos letal para los espermatozoides, mientras que el proceso de vitrificación implica un enfriamiento ultrarrápido (de 2000 a 100000 °C/min) de pequeñas muestras sin el uso de crioprotectores penetrantes que produce más criodaños y conduce a un incremento de espermatozoides no viables (Aristegui Ibarra *et al.*, 2017; Isachenko *et al.*, 2003, 2008).

Por otro lado, en la actualidad se han utilizado nuevas estrategias como la suplementación de antioxidantes en los medios de criopreservación de espermatozoides (Restrepo, Pizarro, *et al.*, 2019). El RES, es un polifenol con una potente actividad antioxidante, que ha demostrado efectos positivos a diferentes niveles, tales como prevención del daño del ADN, control de la sobreproducción de EROS y la mejora del sistema de defensa antioxidante de los espermatozoides (Ahmed *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2019). La eficiencia de la suplementación de RES se ha evidenciado en estudios realizados en humanos (Garcez *et al.*, 2010; Mongioi *et al.*, 2021), carneros (Silva *et al.*, 2012), cabras (Al-Mutary *et al.*, 2020), verracos (Zhu *et al.*, 2019), gallos (Najafi *et al.*, 2019), toros (Assunção *et al.*, 2021) y

equinos (Li *et al.*, 2018). En semen de caballos Árabes de baja calidad, Nouri *et al.*, (2018) evaluaron diferentes concentraciones de RES (5 μ M, 10 μ M, y 20 μ M) y determinaron que la suplementación de 10 μ M de RES al diluyente compuesto por leche semidesnatada, caseinato de sodio y azúcares, suplementado con 4% de yema de huevo y 5% de N,N-dimetilformamida mejoró la MT, MP y la viabilidad. En cambio, los resultados de nuestro estudio mostraron que el método de congelación convencional resultó en una mayor MT y MP en comparación con el método de vitrificación. En este último, la suplementación del RES mejoró significativamente estos valores en comparación con la V-Co.

Por otra parte, en nuestro estudio otras variables cinemáticas como la VCL, VCL-RAP, VSL, VSL-RAP y ALH se vieron afectados por la criopreservación del semen equino, independientemente del método de congelación o vitrificación comparando con las muestras en fresco. Estos resultados son congruentes con un estudio realizado por Tamay *et al.*, (2022) en espermatozoides equinos, quienes reportaron que después de la criopreservación los parámetros cinemáticos (MT, VCL, VAP, VSL, LIN, WOB, ALH, BCF) de las muestras criopreservadas disminuyeron en comparación con las muestras frescas. Asimismo, se ha reportado que la criopreservación de semen humano mediante dos diferentes métodos (Irvine Scientific y Cleveland Clinic Foundation) tiene potenciales efectos deletéreos sobre los parámetros cinemáticos de los espermatozoides, como la motilidad y viabilidad (Nallella *et al.*, 2004). Estas variables tras la descongelación disminuyeron significativamente en comparación con las muestras frescas. Estos hallazgos sugirieron que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides equinos realizado en la presente investigación, pudieron haber expuesto a los espermatozoides al estrés osmótico, causando formación de cristales de hielo, que como consecuencia provoca daño celular, reduce los parámetros cinemáticos y la calidad del espermatozoides (Di Santo *et al.*, 2012; Til *et al.*, 2016).

También se ha reportado que la crioconservación de espermatozoides de bovino mediante vitrificación resultó en una reducción significativa de los valores de VCL, VAP, VSL, ALH y BCF en comparación con la congelación convencional (Amón Togra & Jaramillo López, 2023). En nuestro estudio la congelación convencional independientemente de la suplementación o no de RES (C-Res y C-Co) produjeron una mayor VCL, ALH, y BCF que el tratamiento V-RES. Por el contrario, el método de congelación convencional con y sin

adición de RES produjo menores valores de VSL y VSL-RAP comparado con los el método de vitrificación (V-Co). Además, las variables de LIN y WOB fueron significativamente más altas tras la vitrificación que luego de la congelación convencional. Los parámetros cinemáticos VAP, VSL y VCL, son importantes en la evaluación del semen de los mamíferos, ya que están relacionados con el transporte de espermatozoides en el tracto genital de la hembra y tienen una correlación con la tasa de fertilización (Robayo *et al.*, 2008; Verstegen *et al.*, 2002). Asimismo, las muestras espermáticas con valores altos de LIN y BCF presentan una mejor migración y penetración en el moco cervical (Mortimer, 2000; Verstegen *et al.*, 2002).

Es bien conocido que el proceso congelación- descongelación produce criolesiones en la membrana plasmática y acrosoma de los espermatozoides mamíferos debido al estrés térmico que ocurre a temperaturas menores o iguales a 5 °C (Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022; Yeste, 2016). Este proceso genera cambios en la organización y degradación peroxidativa de las bicapas lipídicas, altera la integridad de las membranas espermáticas, los cuales afectan a las características seminales con tendencia a la pérdida de la calidad espermática (Aitken *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2022; Tayupanta & Villafuerte, 2022).

La integridad de la membrana plasmática es muy importante para la funcionalidad del espermatozoide, esta tiene un papel fundamental en el metabolismo espermático, y los procesos antes de la fecundación como la capacitación y la reacción acrosómica (Rubio - Guillén *et al.*, 2009). De igual manera, la capacidad para sobrevivir a temperaturas bajas depende de la permeabilidad de la membrana plasmática (Oldenhof *et al.*, 2012). Previamente, un estudio desarrollado en espermatozoides equinos demostró que el proceso de criopreservación afectó la integridad de la membrana plasmática y la membrana acrosomal (IPIA), conduciendo a una reducción significativa de sus valores porcentuales en comparación con las muestras frescas (24.3 % vs 82.7% respectivamente) (Tamay *et al.*, 2022).

Por consiguiente, con el propósito de reducir el daño de la integridad de las membranas y los efectos tóxicos de los radicales libres durante la criopreservación del espermatozoide, los diluyentes de semen se han suplementado con un novedoso compuesto antioxidante como el RES. Nouri *et al.*, (2018) indicaron que en espermatozoide equinos la adición de 10 μ M

de RES fue efectiva sobre la integridad de la membrana plasmática y el potencial de la membrana mitocondrial en comparación con las muestras control (55,34 vs 50,33 % respectivamente). En espermatozoides de chivo se ha probado diferentes concentraciones de RES (10, 50, 100 y 250 μM) y la utilización de 10 μM resultó ser la más efectiva en la protección de la integridad del acrosoma en comparación con el grupo control y las demás concentraciones (Lv *et al.*, 2019). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de nuestro estudio, dado que tras la descongelación evidenciamos una mejora en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal (IPIA) en el tratamiento con suplementación de RES en comparación con el control. Interesantemente, el efecto crioprotector del RES fue aún más evidente en las muestras vitrificadas-calentadas, y se demostró una interacción significativa entre el método de criopreservación y la segmentación o no de RES.

Sin embargo, el efecto protector de RES sobre la membrana plasmática y acrosomal parece ser dependiente de la dosis en otras especies, donde se ha evaluado su efecto utilizando diferentes concentraciones, que son notablemente superiores a la utilizada en los diluyentes de criopreservación de semen equino. Assunção *et al.*, (2021). reportaron que la suplementación de 0,05 mM de RES al diluyente de congelación mejoró significativamente la integridad de la membrana plasmática y acrosoma en espermatozoides de bovino. Otro estudio realizado en espermatozoide de bovino indicó que la adición de 50 μM de RES al diluyente sintético TCG + YH + 5% glicerol mejoró significativamente el porcentaje de IPIA y redujo el valor indeseable de DPDA (Amón Togra & Jaramillo López, 2023). Por lo tanto, Galarza *et al.*, (2023) sugirieron que el uso de este aditivo es una excelente estrategia para proporcionar un efecto antioxidante y crioprotector de los espermatozoides, mejorando los parámetros cinemáticos (motilidad total, progresiva y BCF), protegiendo la integridad de la membrana y disminuyendo la oxidación durante la congelación convencional.

El RES tiene la capacidad de alcanzar membranas rígidas, aumenta la fluidez de la membrana e interactúa eficientemente con los radicales en la bicapa lipídica desordenada (Collodel *et al.*, 2011). No obstante, en nuestro estudio identificamos que el método de congelación también afectó la integridad total de la membrana plasmática, dado que un menor porcentaje de espermatozoides después del método de vitrificación mantuvo la integridad total de la membrana plasmática (Total IP) en comparación con el método de congelación convencional.

Por otra parte, el estrés oxidativo que ocurre al momento de la criopreservación, conduce a un incremento en la producción de EROS, desencadena la oxidación de ácidos grasos de las proteínas y el AND de los espermatozoides, provocando una disminución de la movilidad, viabilidad y la capacidad antioxidante (Restrepo *et al.*, 2016). En nuestra investigación el efecto antioxidante del RES fue evidenciado en el método de congelación convencional, ya que un menor porcentaje de EO-Total fue observado en el tratamiento con C-RES (7,9%) en comparación con C-Co (10,4 %).

Además, identificamos que el método de vitrificación independientemente de la suplementación de RES produjo menor EO-Total en comparación con C-Co. Estos datos son congruentes con una investigación realizada en humanos donde se indicó que el estrés oxidativo fue más evidente en las muestras de baja calidad sometidas a congelación en comparación con las de vitrificación (Tello, 2019). Esto podría haber ocurrido debido a la actividad mitocondrial reducida tras el enfriamiento y la congelación (Peña *et al.*, 2015). En caballos se conoce que la peroxidación de lípidos es baja en espermatozoides frescos, pero incrementa significativamente después de la congelación-descongelación como lo reportó (Ortega Ferrusola *et al.*, 2009). Además, el proceso de vitrificación causa menor daño a las mitocondrias, y es más conservador con los microtúbulos de la cola (Isachenko *et al.*, 2008). Aunque, una investigación previa en espermatozoides equinos indicó que la suplementación de antioxidantes (cafeína y melatonina) al diluyente de criopreservación no redujo los niveles de estrés oxidativo tras la descongelación (Tamay *et al.*, 2022).

El efecto antioxidante del RES, ha sido comprobado en otras especies. En espermatozoides de verraco la suplementación de 1 mM de RES al diluyente TCG + YH 20% ayudó eficientemente a reducir el daño oxidativo en comparación con el grupo sin suplementación (88,41% frente a 58,65% respectivamente) (He *et al.*, (2020). En espermatozoides de bovino, un estudio anterior reveló que el uso del RES en el diluyente de criopreservación no mejoró el EO-Total después de la congelación convencional; sin embargo, el RES tuvo un potente papel antioxidante después del método de vitrificación, donde el estrés oxidativo fue mayor (Amón Togra & Jaramillo López, 2023). Por lo tanto, existe fuerte evidencia que la suplementación de antioxidantes a los diluyentes de equino (Nouri *et al.*, 2018) verraco (Bucci *et al.*, 2018) humano (Collodel *et al.*, 2011) bovino (Bucak *et al.*, 2015) y carnero

(Sarlos *et al.*, 2002) reduce el porcentaje de espermatozoides que sufren estrés oxidativo, mejorando la calidad del espermatozoide post-descongelación y aumenta el potencial fertilizante de los espermatozoides (Gadani *et al.*, 2017; Lv *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2012).

Otra de las alteraciones moleculares importantes que ocurren durante el proceso de criopreservación es la fragmentación del DNA, que se desencadena por la liberación de EROS, que sobrepasa la capacidad antioxidante del espermatozoide. Las concentraciones elevadas de EROS afectan la supervivencia del espermatozoide vía mecanismo de apoptosis intrínseca caracterizada por peroxidación de PUFAs ricos en la membrana espermática y daño del ADN (Upadhyay *et al.*, 2021). Investigaciones previas han reportado que existe una marcada variabilidad individual en la especie equina en los niveles de fragmentación del ADN de los espermatozoides congelados-descongelados (Gutiérrez-Cepeda *et al.*, 2012; López-Fernández *et al.*, 2007). Estos hallazgos son consistentes con nuestra investigación, dado que el factor “reproductor” fue significativo, lo que demuestra que existen diferencias en el porcentaje de fragmentación entre caballos.

El uso del RES en los medios de criopreservación de semen equino ha mostrado resultados contradictorios en términos de reducción del daño del DNA. Giaretta *et al.*, (2014) en espermatozoide equinos reportaron que el tratamiento de 10 μ M de RES no tuvo efecto sobre la calidad espermática, y particularmente el porcentaje de células con daño del ADN no mostró diferencias significativas. A pesar de esto, el porcentaje de daño del ADN en ambos grupos fue superior al 26%. Por el contrario, Nouri *et al.*, (2018) observaron un efecto positivo luego suplementación de 10 μ M de RES en el diluyente de criopreservación, dado que los espermatozoides congelados-descongelados mostraron menor porcentaje de fragmentación del ADN (28.57%) que el control (32.68%). Estos resultados se pueden explicar debido a que el RES favorece la defensa antioxidante y minimiza los efectos nocivos asociados al estrés oxidativo que desencadena la fragmentación del ADN, que suelen presentarse en los procesos criopreservación (Nouri *et al.*, 2018).

Estos resultados difieren a los de nuestro estudio, dado que no evidenciamos un efecto de la suplementación del RES sobre el porcentaje de fragmentación del ADN en el tratamiento C-RES en comparación con C-Co. Sin embargo, el porcentaje de fragmentación de ADN fue significativamente menor tras el método de vitrificación en comparación que la

congelación convencional. Interesantemente, los porcentajes de fragmentación se muestran inferiores a los reportados por Nouri *et al.*, (2018). Es probable que esto ocurrió debido a la pobre calidad de semen que fue utilizado en tal estudio. En otras especies como bovinos (Bucak *et al.*, 2015), verraco (Zhu *et al.*, 2019), y búfalo (Ahmed *et al.*, 2020), el RES ha mostrado su potente efecto protector sobre la integridad del DNA. Estos estudios han demostrado que el RES minimiza el daño al ADN después del procedimiento de descongelación (Collodel *et al.*, 2011).

Otra investigación desarrollada en espermatozoides equinos no encontró diferencias en el porcentaje de fragmentación del ADN en muestras vitrificadas con diferentes concentraciones de trehalosa (0,15 M, 0,3 M y 0,5M) (Pérez-Marín *et al.*, 2018). Estos resultados son congruentes con nuestro estudio ya que los tratamientos V-RES y V-Co, donde utilizamos trehalosa como crioprotector no penetrante (0,1M) no mostraron diferencias el porcentaje de fragmentación del ADN. No obstante, en nuestra investigación evidenciamos que la fragmentación del ADN en el esperma equino resultó menor después del proceso de vitrificación en comparación con las muestras tras congelación convencional, lo que evidencia que el proceso de vitrificación fue más eficiente en términos de daño del ADN que la congelación convencional. A pesar de esto, la vitrificación es un proceso con una baja capacidad para preservar el semen equino, ya que son más sensibles a los cambios osmóticos (Restrepo, Varela, *et al.*, 2019). Por último, es importante señalar que se necesita realizar más estudios del efecto de la suplementación del RES sobre la calidad del esperma equino.

Conclusiones

Los resultados de la investigación indican que, en términos generales, la congelación convencional mostró una mejor respuesta criogénica que la vitrificación, independientemente de la presencia de un agente crioprotector (RES). Sin embargo, la vitrificación demostró ventajas en términos de velocidad rectilínea, oscilación y linealidad, así como una menor fragmentación del ADN en comparación con la congelación convencional. A pesar de que la congelación convencional con RES solo redujo el estrés oxidativo, la vitrificación con RES mejoró la motilidad y la integridad de las membranas. Se observó una interacción entre el tipo de criopreservación y la adición de RES, donde la congelación convencional con RES superó a la vitrificación en ciertos aspectos, como la motilidad total y la integridad de las membranas. Además, las muestras vitrificadas con RES

mostraron beneficios, como una menor fragmentación del ADN y un menor porcentaje de células indeseables en comparación con las muestras vitrificadas sin RES. En términos de estrés oxidativo, la vitrificación resultó en menores niveles totales que la congelación convencional, aunque el RES demostró tener propiedades antioxidantes en la congelación. En cuanto a la fragmentación del ADN, la vitrificación generó menores porcentajes en comparación con la congelación. Estos hallazgos sugieren que la vitrificación, especialmente cuando se combina con RES, puede ser una técnica atractiva en términos de preservación de la calidad espermática.

El resveratrol mejoró los porcentajes de motilidad en el método de vitrificación, al igual que en los parámetros de relación de progresión, que se obtuvieron resultados favorables, no obstante, se observó que en cuanto a las velocidades y los valores de ALH, y BCF no se demostraron evidencias significativas del mismo.

En cuanto a la integridad de membrana plasmática al igual que en las motilidades se obtuvieron resultados favorables en la vitrificación con la adición del RES, ya que se observaron porcentajes más altos de IPIA y total IP, y un menor porcentaje de DPIA; en cambio en la integridad acrosoma se obtuvieron mayores porcentajes con el método de congelación.

Referente a la fragmentación del ADN se pudo evidenciar que con el método de vitrificación añadido el RES se lograron menores porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado.

Y en relación con el estrés oxidativo demostró de igual forma que en el método de vitrificación con adición del RES los porcentajes de espermatozoides con EO era menor, no obstante, comparando la C-Co con la C-RES se evidenció el efecto antioxidante del RES.

Recomendaciones

- Realizar más investigaciones en criopreservación de semen equino, para probar diferentes concentraciones de RES, con la finalidad de obtener mejores resultados mediante congelación convencional y vitrificación.

- Utilizar nuevos antioxidantes suplementados al diluyente de semen equino para mejorarla supervivencia espermática en los espermatozoides, disminuir el estrés oxidativo y la fragmentación del ADN; al igual que en maduración in vitro ya que sería interesante esa evaluación.

Referencias

- Ahmad, E., Naseer, Z., Aksoy, M., Küçük, N., Ucan, U., Serin, I., & Ceylan, A. (2015). Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine-induced acrosome reaction in ram spermatozoon. *Andrologia*, *47*(7), 786-792.
- Ahmed, H., Jahan, S., Ullah, H., Ullah, F., & Salman, M. M. (2020). The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, *152*, 106-113.
- Aitken, R. J., Whiting, S., De Iuliis, G. N., McClymont, S., Mitchell, L. A., & Baker, M. A. (2012). Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(39), 33048-33060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.366690>
- Al-Mutary, M. G., Al-Ghadi, M. Q., Ammari, A. A., Al-Himadi, A. R., Al-Jolimeed, A. H., Arafah, M. W., Amran, R. A., Aleissa, M. S., & Swelum, A. A. A. (2020). Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. *Theriogenology*, *152*, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.001>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, *89*(1-4 SPEC. ISS.), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Neto, C. R. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, *32*(3), 521-530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Amón Togra, N. A., & Jaramillo López, J. A. (2023). *Efecto del Resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados*. <https://www2.ucuenca.edu.ec/nosotros/vision-mision#:~:text=Formar investigadores y profesionales comprometidos,a ser agentes de transformación.>
- 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>
- Aristegui Ibarra, F., Machado Esteves, C., & Urioste Arricar, V. (2017). *Comparación entre*

la efectividad de la criopreservación clásica y la vitrificación seminal en chivos durante la estación no reproductiva.

- Assunção, C. M., Mendes, V. R. A., Brandão, F. Z., Batista, R. I. T. P., Souza, E. D., Carvalho, B. C. de, Quintão, C. C. R., Raposo, N. R. B., & Camargo, L. S. A. (2021). Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 226(January). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106697>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., & Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011.
- Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., & Palmer, E. (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 48(3), 391-410.
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338-1344.
- Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., Öztürk, C., Güngör, Ş., Inanc, M. E., & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545-552.
- Bucci, D., Spinaci, M., Yeste, M., Mislei, B., Gadani, B., Martinez, N. P., Love, C., Mari, G., Tamanini, C., & Galeati, G. (2018). Combined effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate on post thaw boar sperm and IVF parameters. *Theriogenology*, 117, 16-25.
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Castex, C., & Miragaya, M. (2015). *Reproductive biotechnology in horses*.
- Chi, H. J., Kim, J. H., Ryu, C. S., Lee, J. Y., Park, J. S., Chung, D. Y., Choi, S. Y., Kim, M. H., Chun, E. K., & Roh, S. I. (2008). Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23(5), 1023-1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/den060>
- Clulow, J. R., Maxwell, W. M. C., Evans, G., & Morris, L. H. A. (2007). A comparison of duck

- and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 232-235.
- Collodel, G., Federico, M. G., Geminiani, M., Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., Figura, N., & Moretti, E. (2011). Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology*, 31(2), 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.11.010>
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Arenas, R., Morrell, J. M., & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of large volumes of stallion sperm in comparison with spheres and conventional freezing: effect of warming procedures and sperm selection. *Journal of Equine Veterinary Science*, 83, 102680.
- Cruz, J. A. C., & Jaramillo, L. C. (2016). Aspectos Generales Del Proceso De Conservación De Semen Equino: Una Revisión Desde La Congelación Espermática. *Conexión Agropecuaria*, 6, 43-64.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology*.
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Ortiz, I., Consuegra, C., Pereira, B., Gonzalez-De Cara, C. A., Aguilera, R., Mari, G., Mislei, B., & Love, C. C. (2018). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 189, 103-109.
- Fahy, G M. (1986). Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. *Progress in Clinical and Biological Research*, 224, 305-335.
- Fahy, Gregory M. (2010). Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*, 60(3), S45-S53.
- Foulkes, J. A. (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction*, 49(2), 277-284.
- Gadani, B., Bucci, D., Spinaci, M., Tamanini, C., & Galeati, G. (2017). Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. *Theriogenology*, 90, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.020>
- Galarza, D., Duma, M., Samaniego, J., Soria, M., & Mendez, S. (2023). Cryopreservation of Domestic and Wild Animal Spermatozoa: Update of Knowledge. In *Intech* (Vol. 11, p. 13). <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

- Galarza, D., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, *91*, 84-89.
- Garcez, M. E., Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility*, *94*(6), 2118-2121.
- Giaretta, E., Bucci, D., Mari, G., Galeati, G., Love, C. C., Tamanini, C., & Spinaci, M. (2014). Is Resveratrol Effective in Protecting Stallion Cooled Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, *34*(11-12), 1307-1312. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.09.011>
- Gibb, Z., Morris, L. H. A., Maxwell, W. M. C., & Grupen, C. G. (2011). Use of a defined diluent increases the sex-sorting efficiency of stallion sperm. *Theriogenology*, *75*(4), 610-619.
- Giugliarelli, A., Urbanelli, L., Ricci, M., Paolantoni, M., Emiliani, C., Saccardi, R., Mazzanti, B., Lombardini, L., Morresi, A., & Sassi, P. (2016). Evidence of DMSO-induced protein aggregation in cells. *The Journal of Physical Chemistry A*, *120*(27), 5065-5070.
- Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, A., Crespo, F., Ramírez, M. Á., Gosálvez, J., & Serres, C. (2012). The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *54*, 72. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-72>
- He, W. hua, Zhai, X. hu, Duan, X. jun, & Di, H. shuang. (2020). Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, *21*(6), 485-494. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900520>
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Ortiz, I., Pereira, B., Sanchez, R., & Crespo, F. (2018). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, *196*, 91-98.
- Horta, F., Alzobi, H., Jitanantawittaya, S., Catt, S., Chen, P., Pangestu, M., & Temple-Smith, P. (2017). Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice. *Asian Journal of Andrology*, *19*(1), 107.
- Ijaz, A., & Ducharme, R. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion

- sperm cooled to 5 C. *Theriogenology*, 44(7), 1039-1050.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. ., Dessole, S., & Nawton, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191-200. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J. ., Kreienberg, R., Katkov, I. I., Schulz, M., Lulat, A. G. M. ., Risopatron, M. J., & Sanchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*, 136(2), 167-173. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0463>
- 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.
- Juan, M. E., González-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodríguez-Gil, J. E., & Planas, J. M. (2005). Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *The Journal of Nutrition*, 135(4), 757-760.
- Kılıç, B., Şimşek, A., Claus, J. R., Atılğan, E., & Aktaş, N. (2015). Effects of different end-point cooking temperatures on the efficiency of encapsulated phosphates on lipid oxidation inhibition in ground meat. *Journal of Food Science*, 80(10), C2161-C2169.
- Le, M. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, V. T., Nguyen, T. T. A., Nguyen, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 234, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.01.001>
- Li, C.-Y., Zhao, Y.-H., Hao, H.-S., Wang, H.-Y., Huang, J.-M., Yan, C.-L., Du, W.-H., Pang, Y.-W., Zhang, P.-P., & Liu, Y. (2018). Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports*, 8(1), 7603.
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., & Tucker, M. J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1671-1680. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006833>
- Liu, J., Tanrikut, C., Wright, D. L., Lee, G. Y., Toner, M., Biggers, J. D., & Toth, T. L. (2016). Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant.

Cryobiology, 73(2), 162-167.

- López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J. L., Arana, P., Johnston, S. D., & Gosálvez, J. (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. II. The stallion. *Theriogenology*, 68(9), 1240-1250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.029>
- Luzko, N. R., Azcurra, M., Benitez, N. B., Miragaya, M., & Stornelli, M. A. (2018). Criopreservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática. *ScientiAmericana*, 5(1).
- Lv, C., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal Reproduction Science*, 208(July), 106127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Morcuende, D., & Pena, F. J. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 141-148.
- Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, 52(5), 675-683.
- Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 273-276.
- Mohamed Shehata Ali, M. (2015). *Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study*.
- Mongioi, L. M., Perelli, S., Condorelli, R. A., Barbagallo, F., Crafa, A., Cannarella, R., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2021). The role of resveratrol in human male fertility. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092495>
- Mortimer, D. (2000). Sperm preparation methods. *Journal of Andrology*, 21(3), 357-366.
- Muñoz, C. D., Gimenez, F. G., & Machado, M. N. M. P. (2013). *Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. Comparación entre leche descremada uht y un diluyente comercial (equipro™)*.
- Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., & Sharafi, M. (2013). Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 371-

375.

- Najafi, A., Daghigh Kia, H., Hamishehkar, H., Moghaddam, G., & Alijani, S. (2019). Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. *Animal Reproduction Science*, 201, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.006>
- Nallella, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S. R., Aziz, N., & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and Sterility*, 82(4), 913-918. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.126>
- Nouri, H., Shojaeian, K., Samadian, F., Lee, S., Kohram, H., & Lee, J. I. (2018). Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality. *Journal of Equine Veterinary Science*, 70, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.07.003>
- Oldenhof, H., Friedel, K., Akhoondi, M., Gojowsky, M., Wolkers, W. F., & Sieme, H. (2012). Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. *Molecular Membrane Biology*, 29(3-4), 95-106.
- Oliveira, R. A. (2013). Criopreservação de sêmen equino, um desafio a ser vencido. *Pubvet*, 7(26). <https://doi.org/10.22256/pubvet.v7n26.1647>
- Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Morrell, J. M., Salazar Sandoval, C., Macías García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2009). Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, 138(1), 55-63. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0484>
- Pace, M. M., & Graham, E. F. (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, 39(6), 1144-1149.
- Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). The role of resveratrol in mammalian reproduction. *Molecules*, 25(19), 4554.
- Peña, F. J., García, B. M., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., & Ferrusola, C. O. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76(7), 1177-1186.
- Peña, F. J., Plaza Davila, M., Ball, B., Squires, E. L., Martín Muñoz, P., Ortega Ferrusola, C., & Balao da Silva, C. (2015). The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 529-537.

<https://doi.org/10.1111/rda.12551>

- Pereira, R. R., Nogueira, B. G., Milan, B., Acacio, B. R., Freitas- Dell'Aqua, C. P., Souza, M. IL, & Sampaio, B. F. (2022). Use Low Ozone Dosages has Positive Effects on the Cooling and Cryopreservation of Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 108, 103800. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103800>
- Pérez-Marín, C. C., Requena, F. D., Arando, A., Ortiz-Villalón, S., Requena, F., & Agüera, E. I. (2018). Effect of trehalose-and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology*, 80, 62-69.
- Pérez, D. D., Acosta, M., Restrepo, G., Camacho, C., & Pérez, J. (2017). Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 918-927.
- Pineda González, S., & Pinilla Arenas, S. M. (2007). *Comparación de dos diluyentes Lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo en la preservación de semen equino.*
- Prien, S. (2016). Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 3(1). <https://doi.org/10.15406/jdvar.2016.03.00063>
- Ramónez, J., Landívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez, D. (2017). *Effect of nonpermeable cryoprotectants and commercial one on the physical characteristics of postfreeze bovine semen.* Ecuador.
- Rees, J. M., Ford, W. C. L., & Hull, M. G. R. (1990). Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *Reproduction*, 90(1), 147-156.
- Requena, F. (2018). *Contributions to the reproductive knowledge in spanish purebred horses : fertility , sperm vitrification and pregnancy monitorization.*
- Restrepo Betancur, G., Juan, ;, Cortés, E. D., David, J., & Páez, M. (2012). Effect of two protocols of cryopreservation one fertilizing capacity of stallion (Equus caballus) semen. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(2), 6711-6718.
- Restrepo, G. ., Pizarro, E. ., & Rojano, B. (2019). Aporte antioxidante del plasma seminal y su efecto sobre la calidad del semen equino congelado. *Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(1), 276-287. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15699%0AAporte>
- Restrepo, G., Montoya, J. D., & Rojano, B. (2016). Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación de semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina.

- Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(3).
<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62747>
- Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., & Rojas, M. (2019). Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.006>
- Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., & Cox, J. F. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4), 393-399.
- Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., & González Villalobos, D. M. (2009). Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. *Revista Científica*, 19(4), 382-389.
- Sánchez, R., Mansilla, M., Risopatrón, J., Schulz, M., Isachenko, V., & Isachenko, E. (2015). Vitrification of mammalian spermatozoa. *Spermova*.
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43(4), 233-241.
- Sandoval, R., Santiani, A., Ruiz, L., Leyva, V., Coronado, L., & Delgado, A. (2007). Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 18(2), 107-114.
- Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., & Ulutaş, P. A. (2009). Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 463-469.
- Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., & al., et. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(2), 235-245.
- Shabani Nashtaei, M., Amidi, F., Sedighi Gilani, M. A., Aleyasin, A., Bakhshalizadeh, S. H., Naji, M., & Nekoonam, S. (2017). Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5'AMP-activated protein kinase activation. *Andrology*, 5(2), 313-326.
- Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. D. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges,

- Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 12(23), 3271.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20-26.
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722-1726. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>
- Slabbert, M., du Plessis, S. S., & Huyser, C. (2015). Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, 47(5), 594-599. <https://doi.org/10.1111/and.12307>
- Squires, E. L. (2013). Semen cryopreservation-challenges and perspectives. *Revista Brasileira de Reproducao Animal*, 37, 136-139.
- Squires, E. L., Keith, S. L., & Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065.
- Stephens, T. D., Brooks, R. M., Carrington, J. L., Cheng, L., Carrington, A. C., Porr, C. A., & Splan, R. K. (2013). Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(8), 615-621.
- Tamay, E., Palacios, P., Peláez, G., Saa, L. R., Dorado, J., Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. A. (2022). Effect of Melatonin and Caffeine Supplementation to Freezing Medium on Cryosurvival of Peruvian Paso Horse Sperm Using a Two-Step Accelerating Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking*, 00(00), 1-8. <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0097>
- Tayupanta, J. E. S., & Villafuerte, J. F. P. (2022). *Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una proceso de criopreservación de semen equino*. 1(1), 19-34.
- Tello, M. de los L. M. L. (2019). *Ensayo comparativo entre congelación lenta y vitrificación espermiática* (Vol. 1).
- Terreros C., M., Huanca L., W., Arriaga C., I., & Ampuero B., A. (2015). Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(3), 420. <https://doi.org/10.15381/rivp.v26i3.11182>
- Til, D., Amaral, V. L. L., Salvador, R. A., Senn, A., & de Paula, T. S. (2016). The effects of storing and transporting cryopreserved semen samples on dry ice. *JBRA Assisted*

Reproduction, 20(4), 217.

Upadhyay, V. R., Ramesh, V., Dewry, R. K., Kumar, G., Raval, K., & Patoliya, P. (2021).

Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. *Andrologia*, 53(8), 1-16. <https://doi.org/10.1111/and.14154>

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.

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

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246(November 2021), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>

Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A., Wu, D., & Zeng, W. (2019). Resveratrol improves Boar sperm quality via 5AMP-activated protein kinase activation during cryopreservation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

Anexos



Anexo A. Elaboración de diluyentes y medios de congelación y vitrificación.



Anexo B. Preparación de la vagina artificial



Anexo C. Recolección de semen mediante vagina artificial



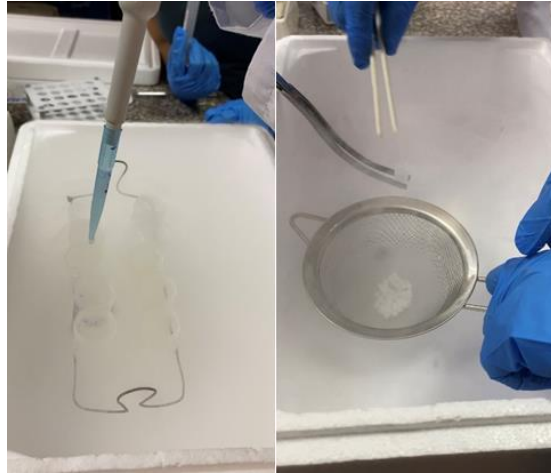
Anexo D. Dilución del semen después de la recolección



Anexo E. Preparación de las pajuelas



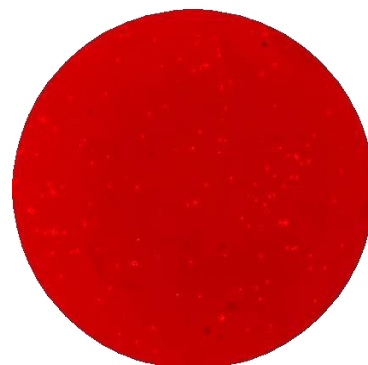
Anexo F. Colocación de pajuelas en rampas con NL_2



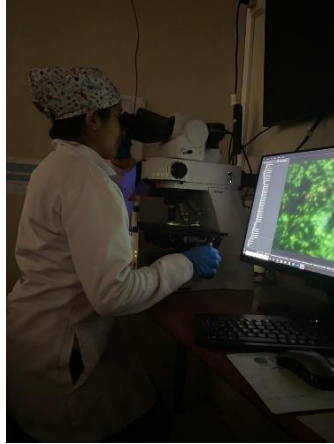
Anexo G. Vitrificación de las muestras espermáticas en pellets ($\sim 30 \mu\text{l}$) a 15 cm de altura del NL_2



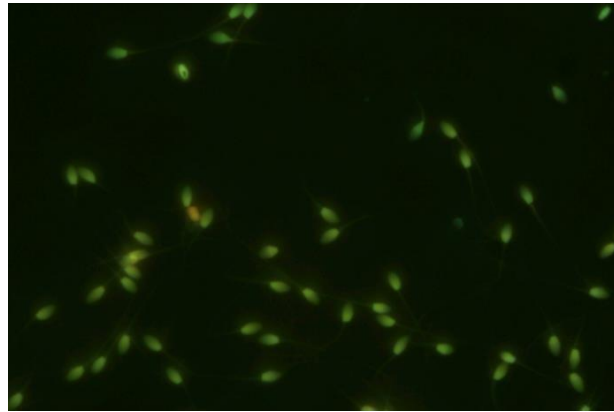
Anexo H. Descongelación y preparación de las muestras previo a la evaluación cinemática



Anexo I. Evaluación cinemática de las muestras



Anexo J. Evaluación de la integridad de membranas por microscopía de epifluorescencia.



Anexo K. Tinción y lavado de placas con Naranja de Acridina, y evaluación y análisis de fragmentación del ADN mediante microscopía de epifluorescencia,