

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de la criosupervivencia de espermatozoides equinos congelados y vitrificados en pellets y pajuelas

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


Autor:

Jefferson Emmanuel Erraez Guaicha

Karen Estefanía Torres Ordóñez

Director:

Edwin Francisco Larriva González

ORCID:  0009-0009-8531-7405

Cuenca, Ecuador

2024-03-18

Resumen

El presente estudio examinó la viabilidad de los espermatozoides equinos después de ser congelados y vitrificados en pellets y pajuelas. Se recopilaron 16 eyaculados de 4 caballos españoles y se dividieron en tres grupos según el método de criopreservación utilizado: Congelación convencional (CC), Vitrificación en pellets (VIT-Pe) y Vitrificación en pajuelas (VIT-Paj). La CC se llevó a cabo en pajuelas de 0,5 ml con DMF 5% y vapores de nitrógeno líquido (NL²); la VIT-Pe se realizó con 100 mM de trehalosa sumergiendo las muestras en gotas directamente en NL²; mientras que la VIT-Paj se realizó con 100 mM de trehalosa sumergiendo pajuelas de 0,25 ml insertadas dentro de pajuelas de 0,5 ml y sumergiéndolas horizontalmente en NL². Los parámetros cinemáticos se vieron afectados por los procesos de congelación y vitrificación, independientemente de la técnica utilizada. La CC mostró una motilidad total (MT) y progresiva (MP) significativamente más altas en comparación con las vitrificaciones. Sin embargo, VIT-Pe superó significativamente a VIT-Paj en MT. En cuanto a la integridad de las membranas espermáticas, CC fue superior a la vitrificación, pero VIT-Pe mostró mejores resultados que VIT-Paj. En morfometría, se observaron diferencias significativas entre caballos en variables como anchura, área, rugosidad y regularidad. En conclusión, la CC fue más efectiva que la vitrificación, pero VIT-Pe mostró un mejor rendimiento en la supervivencia espermática.

Palabras clave: viabilidad espermática, criopreservación, congelación, calidad seminal



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The present study examined the viability of equine spermatozoa after being frozen and vitrified in pellets and straws. A total of 16 ejaculates from 4 Spanish horses were collected and divided into three groups according to the cryopreservation method used: Conventional freezing (CC), Pellet vitrification (VIT-Pe), and Straw vitrification (VIT-Paj). CC was carried out in 0.5 ml straws with 5% DMF and liquid nitrogen (NL²) vapor; VIT-Pe was performed with 100 mM trehalose by submerging the samples in droplets directly into NL²; whereas VIT-Paj was conducted with 100 mM trehalose by submerging 0.25 ml straws inserted into 0.5 ml straws horizontally into NL². Kinematic parameters were affected by the freezing and vitrification processes, regardless of the technique used. CC showed significantly higher total motility (TM) and progressive motility (PM) compared to vitrification. However, VIT-Pe significantly outperformed VIT-Paj in TM. Regarding sperm membrane integrity, CC was superior to vitrification, but VIT-Pe showed better results than VIT-Paj. In morphometry, significant differences were observed among horses in variables such as width, area, roughness, and regularity. In conclusion, CC was more effective than vitrification, but VIT-Pe showed a better performance in sperm survival.

Keywords: sperm viability, cryopreservation, 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

1. Introducción 14

Objetivos..... 16

 a) Objetivo general..... 16

 b) Objetivos específicos 16

Hipótesis..... 16

2. Revisión de literatura 17

 2.1. Semen equino 17

 2.2. Espermatogénesis del equino..... 17

 2.3. Estructura del espermatozoide equino 18

 2.3.1. Membrana plasmática 18

 2.3.2. Cabeza 18

 2.3.3. Cuello..... 18

 2.3.4. Cola espermática 18

 2.4. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos
 19

 2.4.1. Yoduro de propidio (PI) 19

 2.4.2. Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y *Arachis Hypogaea* (PNA)..... 19

 2.5. Morfometría de la cabeza del espermatozoide equino 19

 2.6. Evaluación de motilidad espermática equina 20

 2.7. Criopreservación de esperma equino..... 20

 2.7.1. Congelación convencional 20

 2.7.2. Vitrificación..... 20

 2.7.3. Crioprotectores..... 22

 2.7.4. Factores que determinan la crioresistencia espermática 23

3. Materiales y Métodos 24

 3.1. Materiales 24

 3.1.1. Recursos físicos 24

 3.2. Métodos 25

 3.2.1. Lugar de estudio 25

 3.2.2. Reproductores 25

3.2.3.	Elaboración de diluyentes y medios	27
3.2.4.	Toma de muestras	28
3.2.5.	Diseño experimental	28
3.3.	Análisis de calidad espermática	30
3.3.1.	Evaluación cinemática e integridad de membranas espermáticas	30
3.3.2.	Evaluación de las dimensiones morfométricas de la cabeza	31
3.4.	Análisis Estadístico.....	31
4.	Resultados	32
5.	Discusión	39
	Conclusiones	45
	Recomendaciones	46
	Referencias.....	47
	Anexos.....	56

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación del área de estudio (Girón - Azuay)	25
Figura 2.	Caballos españoles usados en este estudio	26
Figura 3.	Motilidad total y progresiva de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	32
Figura 4.	Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) con sus trayectorias rápidas progresivas (VCL-R y VSL-R) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	33
Figura 5.	Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	34
Figura 6.	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	35
Figura 7.	Comparación de la morfometría de la cabeza de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	38

Índice de tablas

Tabla 1.	Diluyente Botusemen-Gold®.....	27
Tabla 2.	Diluyente Botusemen-Special®.....	27
Tabla 3.	Medio HEPES para fluorescencia.....	27
Tabla 4.	Yoduro de propidio.....	27
Tabla 5.	Aglutinina.....	28
Tabla 6.	Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia (prueba PI / PNA-FITC) de espermatozoides equinos congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets	36
Tabla 7.	Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets.....	37

Agradecimientos

En primer lugar, mi familia, quienes han sido mi fuente constante de inspiración. A mis padres Ángel y Nelly, por su sacrificio y dedicación, por siempre alentarme a seguir mis sueños y por ser mi roca en los momentos desafiantes. A mi hermano Osmani, su respaldo ha sido el motor que me impulsó a alcanzar cada meta.

A Jefferson, mi compañero y confidente, agradezco profundamente tu dedicación, tu amor y tu inquebrantable fe en mí. Este logro es nuestro, y sé que muchos más nos esperan en el futuro.

A mi leal compañera de cuatro patas, Nena. te agradezco por ser mi inspiración constante y por hacer de estos años de estudio una experiencia más alegre y llena de amor.

A mi fiel grupo de amigos, Jefferson, Michell, Michelle y Adriana por su constante apoyo y ánimo durante mi periodo universitario. Su compañerismo y aliento fueron fundamentales para superar los desafíos y celebrar mis logros. Gracias por ser una parte tan importante en este viaje académico.

Gracias a todos ustedes, queridos profesores doctores veterinarios, por compartir su conocimiento, inspiración y dedicación conmigo. Este logro no solo representa el resultado de mi esfuerzo, sino también el reflejo del valioso legado académico que han construido.

A todos ustedes, mi familia, mis amigos y mi querida Nenita, les debo más de lo que las palabras pueden expresar. Gracias por estar a mi lado en esta travesía, por creer en mí y por ser la luz que ilumina mi camino.

**Con gratitud eterna,
Estefanía Torres Ordóñez.**

Agradecimientos

A mis padres, Manuel y Sulema, por su amor incondicional, su apoyo constante, los valores que han guiado mi camino y su incansable dedicación para asegurarse de que no me falte nada. Sin su presencia y sacrificios, este logro no sería posible. Su influencia ha sido la luz que ha iluminado mi sendero.

A mis hermanos, Cristian y Odalis, agradezco que siempre han estado dispuestos a ayudarme y aconsejarme en todo este trayecto, siendo una de las piezas fundamentales en mi vida.

A Estefanía, mi persona y compañera, agradezco inconmensurablemente tu paciencia, comprensión y coraje, pues has sido el motor para muchos proyectos que me he planteado. Este es solo un paso más para todo lo bueno y bonito que nos depara el futuro.

Agradezco de la forma más sincera a mis profesores por haber podido guiar y corregir varias de mis acciones, en busca de la excelencia. Cada lección aprendida bajo su dirección ha sido esencial para mi crecimiento académico.

A mis amigas de la universidad, que día a día hemos compartido grandes anécdotas, pues han sido un refugio para que esta etapa sea muy bonita y llevadera.

A Chapo y Cooper, mis fieles compañeros, agradezco su amor y lealtad infinita. Una mención especial a Campeón, quién, aunque ya no está físicamente conmigo, fue mi inspiración total para poder estudiar esta noble carrera.

No quiero quitar crédito a todas las personas que, en algún punto, han hecho grandes aportes en mi vida para que pueda ser una mejor persona. Pero quiero que sepan que estoy infinitamente agradecido por ello. ¡Gracias totales!

Jefferson Emmanuel Erraez Guaicha

Dedicatoria

Dedico este trabajo a aquellos que han sido mi fuente inagotable de inspiración y apoyo a lo largo de esta travesía académica.

A mi familia, mis amigos, Jefferson y Nena por su amor incondicional, apoyo, paciencia y sacrificios que han hecho posible mi educación. Cada logro alcanzado lleva impreso el esfuerzo y la dedicación que ustedes me han inculcado.

Este logro no solo es mío, sino de todos ustedes que han formado parte de mi camino. Gracias por ser mi inspiración y por creer en mí.

Estefanía Torres Ordóñez

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado con profundo cariño a aquellas personas que constituyen la base sólida de mi vida: mi amada familia, cuyo amor y apoyo incondicional han sido mi ancla en cada desafío; mi compañera de vida Estefanía, cuya presencia ha iluminado los días oscuros y compartido las alegrías; mis queridos amigos y amigas, quienes han enriquecido mi camino con risas, comprensión y amistad genuina en esta etapa; y mis leales mascotas, cuya lealtad y cariño han sido una fuente constante de consuelo y felicidad.

Jefferson Emmanuel Erraez Guaicha

Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ACP: Agente crioprotector penetrante

ACNP: Agente crioprotector no penetrante

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

ANOVA: Análisis de varianza

ASMA: Automated Sperm Morphology Analysis

BCF: Frecuencia de batida de flagelo

BSA: Albúmina sérica bovina

CASA: Análisis espermático asistido por computadora

CC: Congelación convencional

DMA: Dimetilacetamida

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPDA: Membrana plasmática y acrosoma dañados

DPIA: Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto

FITC: Isoticianato de fluoresceína

GLY: Glicerol

GV: Gravedades

H: Hora

IA: Inseminación artificial

IPDA: Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado

IPIA: Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto

mM: Milimolar

MIN: Minutos

ml: Mililitros

MP: Motilidad progresiva

MT: Motilidad total

NL₂: Nitrógeno líquido

PI: Yoduro de propidio

p. ej.,: Por ejemplo

PNA: Arachis Hypogaea

PNA-FITC: Doble tinción fluorescente

SLC: Centrifugación monocapa

VA: Vagina artificial

VAP: Velocidad promedio del espermatozoide

VCL: Velocidad curvilínea

VIT: Vitrificación

VIT-Paj: Vitrificación en pajuelas

VIT-Pe: Vitrificación en pellets

VSL: Velocidad rectilínea

WOB: Índice de oscilación

µl: Microlitros

1. Introducción

La criopreservación de semen equino permite almacenar por tiempo indefinido los espermatozoides, para usarlo, posteriormente, en inseminación artificial (IA) de yeguas (Peña et al., 2011). Debido al fácil transporte de semen criopreservado, resulta atractivo en la industria equina al momento de inseminar yeguas en otras latitudes geográficas. Sin embargo, las tasas de fertilidad posterior a una IA con semen congelado y descongelado dependen, estrictamente de la criosupervivencia y de la capacidad fecundante de los espermatozoides equinos después de su criopreservación (Ferrer et al., 2020). La congelación convencional (CC) lenta de espermatozoides equinos mediante la exposición de pajuelas (0,5 ml) a vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático, ha demostrado resultados de criosupervivencia de carácter variado (entre 20 a 50% de viabilidad). Se conoce la CC depende, principalmente, de factores extrínsecos como la raza de caballo y el efecto macho (buenos y malos congeladores) (Tischner, 1979); e intrínsecos como la calidad inicial del semen, el tipo de diluyente (sintético o no sintético), el agente crioprotector penetrante (ACP, Ej., glicerol o amidas), las curvas de congelación (por aceleración o desaceleración) (Oldenhof et al., 2017), entre otros. Durante la CC lenta, los espermatozoides experimentan varios eventos cuando la temperatura desciende; algunos de estos eventos son deletéreos para las células tales como choque de frío, estrés oxidativo y estrés osmótico (tensiones mecánicas). Los espermatozoides, por lo tanto, experimentan cambios estructurales bioquímicos y funcionales (Watson, 2000). Esto cambios se traducen en una disminución de la motilidad, cinética y capacidad fecundante de los espermatozoides equinos.

La congelación convencional es la técnica de criopreservación espermática más utilizada en la especie equina. La criosupervivencia espermática depende de las velocidades en la cual se congelan los espermatozoides. Lo convencional es usar velocidades de enfriamiento por desaceleración (50°C/min, 17°C/min y 3°C/min) ocasionando lesiones celulares debido a la formación de cristales de hielo intracelular. Sin embargo, los protocolos actuales usan velocidades de enfriamiento por aceleración que han proporcionado mejores criorespuesta y viabilidad espermática (9°C/min y 46°C/min) (Tamay et al., 2022). Hasta el momento, la criosupervivencia espermática se ha convertido en un hándicap tecnológico, debido a las tasas de criosupervivencia de carácter variado. Por esta razón, es importante buscar alternativas criogénicas que permitan proteger a los espermatozoides contra todos estos efectos nocivos causados por la congelación.

La vitrificación (VIT) es una técnica simple y económica por lo que resulta más atractiva en los laboratorios comerciales e incluso en condiciones de campo (Pradiee et al., 2015). La VIT resulta

en un método alternativo a la congelación convencional con vapores de NL_2 , que permite preservar a las células alcanzando un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo. Para alcanzar este estado vítreo, los espermatozoides son diluidos con altas concentraciones de agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP) como los carbohidratos disacáridos como la sacarosa o trehalosa (50 a 100 mM); estas muestras se sumergen directamente en NL_2 en pequeños volúmenes (30 a 50 μ l). Esto provoca que las velocidades de enfriamiento sean extremadamente altas (15.000 a 20.000 $^{\circ}C/min$) formándose esferas o pellets (Holt y Penfold, 2014). Se ha reportado que la VIT protege mejor la integridad estructural de los espermatozoides, sin embargo, una desventaja de esta técnica se atribuye a la toxicidad provocada por las altas concentraciones de los ACNP y el estrés osmótico ejercido a las células (Katkov et al., 2012). Más allá de aquello, la VIT se ha utilizado con éxito en espermatozoides humanos (Isachenko et al., 2008) y de diferentes animales mamíferos domésticos y silvestres (O'Brien et al. 2019). Sin embargo, hasta la actualidad, existen limitados reportes sobre esta técnica en especies domésticas incluyendo al espermatozoide equino (Hidalgo et al., 2018a).

El éxito de la VIT de espermatozoides equinos depende de varios factores tales como el volumen de semen, los medios (aditivos y crioprotectores), y el tiempo previo al proceso de vitrificación (Consuegra, et al., 2019a). Se ha demostrado previamente que la trehalosa a una concentración de 100 mM adicionada al diluyente, estabiliza las proteínas de las membranas de los espermatozoides equinos, mejorando la calidad espermática en comparación del glicerol (Athurupana et al., 2015). Sin embargo, la exposición directa y el volumen muy bajo sigue siendo una técnica que supone contaminación de las muestras. Otra alternativa de vitrificación es el uso de pajuelas usando volúmenes y concentraciones más altos espermatozoides sin el contacto directo con el NL_2 (evitando el riesgo de contaminación) (Isachenko et al., 2017). Previamente ya se vitrificó satisfactoriamente el semen equino utilizando un diluyente con 100 mM de trehalosa y en pajuelas de 0,25 ml llenas con un volumen de 100 μ l y una 100×10^6 espermatozoides/ml, con resultados de calidad espermática más altos a los obtenidos después de la congelación convencional (Consuegra, et al., 2019a).

Objetivos

a) Objetivo general

Evaluar la criosupervivencia de espermatozoides equinos congelados y vitrificados en pellets y pajuelas.

b) Objetivos específicos

- Valorar la cinemática e integridad de membranas de espermatozoides equinos congelados y vitrificados, ya sea en pellets (30 μ l) o pajuelas (0,25ml).
- Evaluar las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides equinos ya sea congelados y vitrificados en pellets (30 μ l) o pajuelas (0,25ml).

Hipótesis

La vitrificación de espermatozoides equinos en pajuelas podría resultar igual de eficiente que la vitrificación en pellets y que la congelación convencional, al usar un medio de vitrificación con 100 mM de trehalosa, una concentración de 50×10^6 esp/ml y volúmenes entre 100 y 120 μ l.

2. Revisión de literatura

2.1. Semen equino

El semen se forma a partir de la combinación del plasma seminal con los espermatozoides, manifestándose como un fluido gelatinoso de tonalidad blanca lechosa. Su composición exhibe variaciones en la concentración de espermatozoides, clasificándose en tres categorías distintas según la fracción analizada: pre-espermatozoides, fracción rica en espermatozoides y post-espermática. (Morel, 2020). La concentración normal de espermatozoides oscila entre 30×10^6 a 600×10^6 espermatozoides por mililitro de semen sin diluir (Stout y Colenbrander, 2011). Para lograr tasas de fertilización aceptables, se requiere un mínimo de 100×10^6 espermatozoides móviles progresivos por inseminación (Sieme et al., 2001). En la práctica, se considera que las muestras con concentraciones superiores a 50×10^6 a 200×10^6 espermatozoides por mililitro son normales y adecuadas para la inseminación artificial (McKinnon y Voss, 1993; Morel, 1999).

El volumen normal de semen exhibe una considerable variabilidad, influenciada por factores como la raza, la edad, la temporada, la frecuencia de recolección y la duración de la estimulación del semental previa a la recolección. (Munroe, 2019). El volumen de semen típicamente fluctúa entre 40 a 80 ml en sementales equinos (Morel, 2020).

2.2. Espermatogénesis del equino

La espermatogénesis es un proceso fundamental que comprende la división y diferenciación de células en los túbulos seminíferos del testículo, constando de tres fases distintas: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (Gordon, 2017). Esta secuencia involucra las espermatogonias, que actúan como células madre, recubriendo la base de los túbulos seminíferos y experimentando divisiones mitóticas cíclicas para mantener su número y producir espermatocitos primarios (Varner, 2007). Los espermatocitos primarios, a su vez, someten a meiosis para dar lugar a las espermátidas haploides, las cuales se liberan al lumen de los túbulos seminíferos en forma de espermatozoides maduros (Morel, 2020). El lumen de los túbulos seminíferos alberga tanto células somáticas parenquimatosas como células germinales. Entre estas últimas se encuentran las espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Adicionalmente, las células de Leydig, que son células parenquimatosas somáticas del testículo, son predominantes en el intersticio entre los túbulos seminíferos (Amann y Graham, 2011a).

En términos temporales, la espermatogénesis se desglosa en tres etapas: espermatocitogénesis, con una duración de 19,4 días; meiosis, que abarca también 19,4 días; y espermiogénesis, con

una duración de 18,6 días. En conjunto, el tiempo total necesario para el proceso de espermatogénesis en el semental es de 57,4 días (Morel, 2020).

2.3. Estructura del espermatozoide equino

2.3.1. Membrana plasmática

La membrana plasmática envuelve al espermatozoide en su totalidad, excepto cuando hay una reacción del acrosoma, envejecimiento y muerte. En general, consta de tres zonas: bicapa lipídica, interfaz fosfolipídica-agua y glicocálix (Amann y Pickett, 1987).

En la bicapa de la membrana, diversos fosfolípidos se disponen de manera lamelar y con libertad de movimiento lateral. La presencia de colesterol afecta la fluidez y flexibilidad de esta porción de la membrana, siendo una mayor cantidad de colesterol asociada con una menor fluidez (Hammerstedt et al., 1990). No obstante, bajo ciertas condiciones, los lípidos pueden transicionar hacia matrices cristalinas y las proteínas pueden agregarse, lo que resulta en una mayor inestabilidad y posibles daños irreversibles en la membrana. El enfriamiento es uno de los factores que puede inducir tales cambios (Amann y Graham, 2011b).

2.3.2. Cabeza

La cabeza del espermatozoide alberga el núcleo, cuyo ADN representa el material genético que será transmitido al óvulo (Cupps, 1991). Tanto la cabeza como el núcleo exhiben una forma ancha y relativamente plana. En particular, el acrosoma contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la penetración de las capas protectoras del óvulo durante el proceso de fertilización (Amann y Graham, 2011b).

2.3.3. Cuello

El cuello constituye la conexión entre la pieza intermedia y la cabeza del espermatozoide. Esta región alberga una estructura compleja, que incluye la pieza de conexión, el centríolo proximal, varias mitocondrias pequeñas y una envoltura nuclear redundante. (Amann y Graham, 2011b).

2.3.4. Cola espermática

La cola del espermatozoide equino representa una estructura fundamental para la movilidad y la función reproductiva. Se encuentra diseñada para facilitar la eficiente locomoción de los espermatozoides en dirección al óvulo durante el proceso de reproducción en los equinos. (Amann y Graham, 2011b).

2.4. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos

La estrecha relación entre el espermatozoide y su membrana plasmática nos sirve como indicador de calidad del semen. No solo es útil como un límite celular, sino que también desempeñan un papel fundamental en las interacciones celulares. Por lo tanto, resulta imperativo evaluar la integridad de membranas y el acrosoma (Foster et al., 2011). Hay tinciones que nos permiten realizar dicha evaluación de calidad, tanto en la membrana plasmática y el acrosoma. Para llevar a cabo dicha evaluación de calidad, se utilizó tinciones específicas, entre las que se incluyen el yoduro de propidio (PI) y el isotiocianato de Fluoresceína / *Arachis Hypogaea* (FITC / PNA) en esta investigación.

2.4.1. Yoduro de propidio (PI)

La tinción fluorescente PI se adhiere al ADN. Aquellas con una membrana plasmática íntegra evitarán que el PI penetre y coloree el núcleo. En contraste, las células con daño en la membrana plasmática permitirán la entrada del PI, facilitando su unión al ADN y generando una fluorescencia roja en las células. (Zhu y Li, 2015).

2.4.2. Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y *Arachis Hypogaea* (PNA)

La unión del FITC/PNA a residuos de β -galactosa vinculados a la membrana acrosómica externa induce la fluorescencia en la región acrosómica de las células que exhiben daño acrosómico. (Flesch et al., 1998). Las lectinas en sí mismas no son fluorescentes, pero pueden marcarse con muchas sondas fluorescentes diferentes (Graham, 2001).

2.5. Morfometría de la cabeza del espermatozoide equino

La evaluación morfológica es uno de los parámetros más utilizados como indicador de la calidad del esperma (Phetudomsinsuk et al., 2008). La capacidad fecundante del espermatozoide depende de la forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide, influyendo en la dinámica de la reacción acrosómica y en la capacidad de penetración del óvulo por parte de los espermatozoides. (Davis et al., 1993). Por ende, el aumento de las anomalías morfológicas de las cabezas de los espermatozoides se correlaciona tanto con una reducción de las tasas de preñez (Casey et al., 1997) y negativamente con la fertilidad de los sementales (Jasko et al., 1990). Las medidas de la cabeza del espermatozoide en el semental abarcan: una longitud de 5,33 μm a 6,62 μm , un ancho máximo de 2,79 μm a 3,26 μm , una relación larga/ancho de 0,43 a 0,52, un ancho en la base de 1,45 μm , y una circunferencia que oscila entre 13,76 μm y 15,64 μm . En cuanto a la superficie, varía de 11,43 μm^2 a 16,28 μm^2 . (Brito, 2007; Pesch y Bergmann,

2006). La aplicación de análisis de esperma asistido por computadora posibilita la evaluación objetiva de los parámetros de la eyaculación, abarcando aspectos como la motilidad y concentración de espermatozoides. En los modelos más recientes, se incorpora incluso un módulo de morfología. (Samper, 2008).

2.6. Evaluación de motilidad espermática equina

La motilidad espermática es otro de los indicadores importantes y utilizados para la evaluación de calidad del esperma (Křížková et al., 2017). El análisis de esperma asistido por computadora es método objetivo para el análisis de motilidad, progresividad e hiperactividad (Pesch y Bergmann, 2006). El CASA se basa en la sucesiva captura de imágenes microscópicas para luego digitalizarlas. Los espermatozoides móviles observados se identifican y se trazan sus trayectorias (Gacem et al., 2020). Finalmente, las trayectorias obtenidas se procesan matemáticamente, lo que permite definirlos de forma numérica, reflejando una serie de parámetros que definen con precisión el movimiento individual de cada espermatozoide (Quintero-Moreno et al., 2003).

2.7. Criopreservación de esperma equino

2.7.1. Congelación convencional

Para aprovechar los potenciales beneficios de la inseminación artificial, se requiere un almacenamiento a largo plazo, el cual se logra mediante la congelación. Este método detiene los procesos metabólicos del esperma, permitiendo un resguardo indefinido a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido, manteniendo las tasas aceptables de fertilización después de la descongelación gvs (Vidament et al., 1997). Sin embargo, es evidente que, en general, las tasas de preñez con semen congelado no son tan altas en comparación con el semen fresco, siendo aceptables las tasas de concepción del 35-60% en la práctica de IA comercial (Deng et al., 2014).

2.7.2. Vitrificación

La vitrificación es un método de criopreservación que consiste en la solidificación de un líquido en un sólido amorfo similar al vidrio sin la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos (Agarwal y Tvrda, 2017). Esto para minimizar daños que causan los cristales de hielo intracelulares que se forman durante la congelación (Samper, 2008). En este procedimiento, es necesario exponer el esperma a un diluyente con una elevada concentración de crioprotectores en un intervalo de tiempo extremadamente breve. Esto induce la deshidratación del esperma previa a la congelación, previniendo así la formación de cristales de hielo. Luego, se lleva a cabo una congelación ultra rápida mediante la inmersión en nitrógeno líquido; de igual manera, el

proceso de descongelamiento debe ser sumamente veloz. (Wowk, 2010). La deshidratación se logra utilizando un crioprotector no penetrante, como azúcares disacáridos (p. ej., sacarosa o trehalosa) o azúcares trisacáridos (p. ej., rafinosa). Se añaden al diluyente en concentraciones elevadas, aumentando la presión osmótica en el líquido circundante, lo que hace que el agua sea rápidamente extraída del esperma para su deshidratación (Galarza et al., 2023; E. Isachenko et al., 2008). El esperma deshidratado se sumerge en nitrógeno líquido (-196 °C) enfriándose a 2,500 °C min⁻¹ y congelándose inmediatamente. Esto da como resultado una transición instantánea a un estado vítreo tanto en el fluido intracelular como extracelular (Schulz et al., 2020). Cuanto más rápido ocurra la transición vítrea, menos daño sufre el esperma; sin embargo, la temperatura de transición vítrea depende en cierta medida de la concentración y tipo del crioprotector (Morel, 2020).

Una de las desventajas de esta técnica en los espermatozoides es el shock osmótico y la toxicidad de las altas concentraciones de crioprotectores permeables (E. Isachenko et al., 2003). El problema de los crioprotectores, especialmente los permeables, es que la mayoría son tóxicos, por lo que producen un daño osmótico que llega a ser severo en los espermatozoides (Zachariassen y Kristiansen, 2000)

2.7.2.1. Vitricación en pajuelas

La técnica de vitricación mediante el método de pellets no es aséptica y emplea volúmenes significativamente reducidos de semen. Resulta idónea para aplicaciones como la fertilización in vitro o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Sin embargo, su utilización se torna impráctica en el contexto de la inseminación intrauterina, lo que afecta negativamente el proceso de inseminación artificial en yeguas. (Govaere et al., 2014; V. Isachenko et al., 2011). Una alternativa a estos problemas es el uso de pajuelas, con ello se aumenta volumen y se evita contaminación cruzada (V. Isachenko et al., 2017). Este método desarrollado se ha utilizado principalmente para investigaciones asociadas a la vitricación de esperma humano, obteniendo resultados prometedores al momento de realizar IA (Sanchez et al., 2012; Slabbert et al., 2015). Esto lo realizaron con el uso de diferentes combinaciones de carbohidratos (sacarosa o trehalosa) y proteínas (albúmina sérica humana) en vez de crioprotectores permeables (Sánchez et al., 2012). La información sobre el uso de esta técnica en diferentes especies animales es escasa. Se han realizado estudios en carneros realizando una combinación de crioprotectores penetrantes y no penetrantes, obteniendo resultados satisfactorios frente a la congelación en pellets. (Daramola et al., 2016; Jiménez-Rabadán et al., 2015). También se han realizado en

burros usando las pajuelas de 0.25 y 0.5 ml con INRA-96 o con Gent en combinación con sacarosa y BSA, obteniendo resultados exitosos (Diaz-Jimenez et al., 2017). Incluso, se realizó una comparativa entre vitrificación en pellets y pajuelas, siendo esta última la que obtendría mejores resultados en la motilidad espermática después del calentamiento (Diaz-Jimenez, Dorado, Pereira, et al., 2018). El detalle es que en estos estudios que se realizaron en burros, utilizaron una concentración fija de agentes no permeables (sacarosa y albúmina sérica bovina) derivados de estudios en humanos (Sanchez et al., 2012), siendo esto un punto negativo, de tal modo que la concentración de crioprotectores no penetrantes y proteínas que se hicieron uso en la criopreservación del semen, son específicas para cada especie, teniendo algunas conclusiones con el uso de la sacarosa en semen de burro (Diaz-Jimenez, Dorado, Ortiz, et al., 2018; Hidalgo et al., 2018b). Esto fue analizado por Consuegra y colaboradores (2018) que realizaron pruebas con semen de sementales y determinaron una concentración con resultados favorables utilizando una combinación de sacarosa 100mM con BSA 1%. Otro factor negativo es que aún no se han podido estandarizar volúmenes óptimos para el semen que van en las pajuelas. Como ya se mencionó anteriormente, la adición de carbohidratos al diluyente permite que haya una mayor viscosidad de la solución que suprime la formación de cristales de hielo y, por lo tanto, mejora el proceso de vitrificación (Arav et al., 2002).

2.7.3. Crioprotectores

Los agentes crioprotectores (ACP) son compuestos químicos empleados en el proceso de criopreservación. Su principal función es resguardar las células de los daños derivados de la congelación y descongelación, mitigando la formación de cristales de hielo en la célula y previniendo la deshidratación celular. Además, los ACP desempeñan un papel crucial al modificar la tasa de transporte de agua, la nucleación del hielo y la formación de cristales de hielo (Galarza et al., 2023). Existen dos tipos de ACP los cuales se detallan a continuación.

2.7.3.1. Agentes crioprotectores penetrantes

Dentro de la categoría de agentes crioprotectores penetrantes se incluyen el glicerol (GLY), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), propanodiol, etinglicol, entre otros. Estos compuestos poseen un bajo peso molecular, lo que les confiere la capacidad óptima para deshidratar la célula a velocidades de enfriamiento reducidas. Además, presentan un tamaño molecular mayor en comparación con los agentes crioprotectores no penetrantes. (Grötter et al., 2019).

2.7.3.2. Agentes crioprotectores no penetrantes

Algunos ejemplos de agentes crioprotectores no penetrantes incluyen la polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y trehalosa, siendo este último utilizado en el contexto de la investigación en cuestión. Estos agentes crioprotectores no penetrantes, caracterizados por su elevado peso molecular, demuestran mayor efectividad cuando se aplican a velocidades de enfriamiento elevadas. Conforme a su denominación, no ingresan a la célula, facilitando la deshidratación celular rápida y promoviendo la viscosidad para reducir la formación de cristales de hielo. En ocasiones, se utilizan en combinación con agentes crioprotectores penetrantes, desempeñando su función crioprotectora al extraer agua intracelular sin necesidad de ingresar a la célula. (Benson et al., 2012; Paoli et al., 2014).

En relación con la trehalosa, se han llevado a cabo estudios en equinos que demuestran su capacidad para mejorar la integridad funcional de la membrana plasmática, el acrosoma y el ADN. Además de potenciar la salud de la membrana mitocondrial, la trehalosa también contribuye a mejorar diversos parámetros de calidad del semen, proporcionándole una protección adicional contra el estrés oxidativo. (Jhamb et al., 2023).

2.7.4. Factores que determinan la crioresistencia espermática

El tiempo de exposición de los espermatozoides a los agentes crioprotectores antes de iniciar el proceso de criopreservación es un aspecto crucial conocido como el tiempo de equilibrio. En este período, se busca lograr una estabilización adecuada de la membrana celular. La duración de este proceso puede variar según la especie y la procedencia de la muestra, ya sea del epidídimo o del eyaculado. La diferencia radica en que las muestras eyaculadas requieren un tiempo de equilibrio más prolongado, generalmente de 2 a 4 horas, mientras que las muestras tomadas del epidídimo pueden necesitar un tiempo de equilibrio más breve, según algunos estudios que sugieren que puede ser tan solo de 1 hora. (Galarza et al., 2016).

Se ha evidenciado que los agentes crioprotectores pueden generar toxicidad al inducir daños en los orgánulos celulares, especialmente en las mitocondrias. Esta toxicidad se intensifica en proporción directa a las concentraciones elevadas de los agentes crioprotectores. (Graham, 2011). Un aspecto crítico se refiere a los daños que se producen durante el proceso de criopreservación, originados por el estrés térmico y osmótico. En estos procedimientos, la membrana plasmática se convierte en la estructura principal afectada de manera irreversible, debido a las alteraciones en los complejos lípido-proteína que ocurren durante la congelación y descongelación, por lo que durante estos procesos el cuidado debe ser máximo. (Yeste, 2016)

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Recursos físicos

- Refrigerador (Haceb, NEV AS 388L, México)
- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo Ph1 con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Cámara de Neubauer (MARIENFELD, Alemania)
- Estufa (Mettler, Alemania)
- Máquina baño maría eléctrico (Mettler, WNB 10 LITROS, Alemania)
- Microcentrífuga (PCL-01 series, K centrifuge ,Taipei Taiwán)
- Platina térmica (Ref: 12055, Minitube, Alemania)
- Guantes de examinación
- Pajuelas 0,25ml y 0,5ml (IMV, L'Aigle Cedex, Francia)
- Tubos eppendorf 1,5ml
- Tubos falcon 15ml y 50ml
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Pipetas automáticas (BOECO, BOE 9610220, Alemania)
- Criotubos NEST Scientific USA Inc®
- Dispositivo de calentamiento STC-500 (Fabricante local)
- Máquina termoselladora
- Papel aluminio
- Liners de colecta
- Hemocitómetro
- Centrifuga 800-1
- Vaso de precipitación 20ml (GLASSCO, GL-229.402.02)
- Caja criogénica de poliestireno con dos rampas de congelamiento.
- Vagina artificial (Ref: 11021/0020, Minitube GMBH, Alemania)

3.1.2. Reactivos

- Diluyente Botusemen-Special® (Ref: 550/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- Diluyente Botusemen-Gold® (Ref: 008/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- ACP Dimetilformamida (DMF)

- Albúmina sérica bovina BSA
- Trehalosa (000, Sigma - Aldrich)
- Nitrógeno líquido
- Yoduro de propidio (PI, P4170, Sigma - Aldrich)
- Aglutinina (PNA-FITC, L7381, Sigma - Aldrich)
- HEPES
- Tinción **SpermBlue®**

3.1.3. Recursos biológicos

- Esperma equino (Eyaculado de cuatro sementales raza española)
- Agua bidestilada

3.2. Métodos

3.2.1. Lugar de estudio

La recolección de muestras se llevó a cabo en la hacienda “Yeguada El Carmen” ubicado en la comunidad Lentag, perteneciente al cantón Girón de la provincia del Azuay (latitud -2,35; longitud -79,2333), a una altitud de 1.503 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 17°C.



Figura 1. Ubicación del área de estudio (Girón - Azuay)

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicada en la granja de Irquis.

3.2.2. Reproductores

Los reproductores fueron 4 caballos españoles adultos: Granero, de 16 años; Capitán, de 11 años; Poderoso e Isleño, ambos de 7 años. Cada uno de estos ejemplares sigue una rutina planificada con la finalidad de garantizar su salud y rendimientos óptimos. Se alimentan tres

veces al día, a las 7am, 12pm y 5pm con una dieta balanceada de *Derby Mantenimiento* dosificada en 4 libras por comida, además, reciben un tercio de paca de alfalfa o avena, que equivale a 10 libras, el cual es repartido entre comidas a las 10am, 3pm y 6pm. Estos sementales mantienen una condición corporal entre 5 y 7 en una escala del 1 al 10. Siguen un plan de ejercicio regular que incluye dos días de monta, tres días de trabajo a la cuerda y dos días de descanso suelto, especialmente durante el fin de semana. Para garantizar su bienestar, se mantienen en un ambiente libre de anemia infecciosa equina, se desparasitan cada tres meses y se administra un plan de vitaminas después de cada desparasitación, además, se administra sal mineral a voluntad. En cuanto a reproducción, las madres son manejadas mediante inseminación artificial y las yeguas se preñan en los meses de febrero y marzo con el objetivo de tener crías a principios de año, lo que les permite aprovechar la época de buenos pastos y prepararse para competir en la feria del caballo español, esto garantiza que los potros nacidos en enero y febrero tengan un tamaño adecuado para la competición en comparación con los nacidos a finales del año. Es importante destacar que estos sementales no son sometidos a monta directa, sino que se realiza la recolección del semen, con el objetivo de salvaguardar su salud.



Figura 2. Caballos españoles usados en este estudio. Fuente: Los autores (2023)

3.2.3. Elaboración de diluyentes y medios

Todos los diluyentes y medios fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal.

Los diluyentes se realizaron según las recomendaciones de sus casas comerciales y se detallan a continuación.

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 µL y se congeló a -20 °C.

En las siguientes tablas se detallan los diferentes reactivos para elaborar las tinciones fluorescentes.

Tabla 3. Medio HEPES para fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes Salt	476,62 mg
NaCL	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua Destilada	100 ml

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

Tabla 4. Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 mg

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

Tabla 5. Aglutinina

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

Se almacenó en alícuotas de 50 μ L y se congeló a -20 $^{\circ}$ C.

3.2.4. Toma de muestras

Se recolectaron un total de 16 eyaculados de semen de 4 caballos españoles adultos, clínicamente sanos, activos sexualmente y con fertilidad probada. Cada caballo fue sometido a la recolección de 1 eyaculado por semana a lo largo de 4 semanas, utilizando la vagina artificial (VA). Estos ejemplares son reproductores profesionales con reconocimientos a nivel nacional e internacional, lo que garantiza su entrenamiento previo y necesario para la colección. La VA utilizada fue preparada a una temperatura de 40 a 47 $^{\circ}$ C, y antes de cada colecta, se procedió a lavar el pene de cada ejemplar con agua a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la obtención de las muestras, se llevó a cabo una dilución 1:1 con Botusemen-Special $^{\circ}$ para su posterior transporte al Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal.

3.2.5. Diseño experimental

En este estudio, se llevó a cabo una evaluación de la criosupervivencia de espermatozoides equinos, los cuales fueron congelados y vitrificados, utilizando tanto pellets como pajuelas. Cada eyaculado fue diluido en una proporción de 1:1 con Botusemen-Special $^{\circ}$ y luego centrifugado a 400 gv durante 10 minutos. El pellet resultante se volvió a suspender con el diluyente Botusemen-Gold $^{\circ}$ para lograr una concentración inicial de 100×10^6 espermatozoides/ml. Con esta dilución base, se llevaron a cabo tres protocolos de criopreservación:

- T1= Congelación Convencional (CC) (Un total de 96 pajuelas fueron congeladas; 6 pajuelas / eyaculado; 24 pajuelas / caballo)
- T2= Vitrificación en pellets (VIT-Pe) (Se vitrificó un total de 32 criotubos; 2 criotubos / eyaculado; 8 criotubos / caballo).
- T3= Vitrificación en pajuelas (VIT-Paj) (Se vitrificó un total de 32 criotubos; 2 criotubos / eyaculado; 8 criotubos / caballo).

3.2.5.1. Definición de Variables

Variables dependientes

- Viabilidad espermática
- Motilidad espermática
- Morfología espermática

Variables independientes

- Vitrificación en pellets
- Vitrificación en pajuelas
- Congelación convencional
- Semen fresco
- Semen descongelado y calentado

3.2.5.2. Congelación Convencional (CC)

El semen se ajustó a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml mediante el mismo diluyente, el cual fue suplementado con un 5% de agente crioprotector dimetilformamida (DMF). Después de un periodo de refrigeración de 2 horas, las muestras de semen se congelaron en pajuelas de 0,5 ml. En total, se congelaron 96 pajuelas (6 pajuelas por eyaculado; 20 pajuelas por caballo). El proceso de descongelación se llevó a cabo sumergiendo las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 30 segundos. Este procedimiento de Congelación Convencional (CC) se realizó en pajuelas de 0,5 ml, siguiendo los procedimientos detallados por Tamay et al., (2022).

3.2.5.3. Vitrificación en pellets (VIT-Pe)

El semen fue ajustado a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml utilizando el mismo diluyente, el cual fue enriquecido con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 100 mM de trehalosa (465 mOsm/kg). Luego de una hora de enfriamiento, el semen mezclado con el medio de vitrificación se dispuso en gotas de 30 μ l sobre el NL_2 desde una altura de 15 cm, formando pellets que se almacenaron en criotubos de 2 ml. Se congelaron un total de 32 criotubos (2 criotubos por eyaculado; 8 criotubos por caballo). El proceso de calentamiento se llevó a cabo en un dispositivo STC-3008 ajustado a una temperatura de 65°C. Los pellets se depositaron en las platillas térmicas durante 3 segundos, y el contenido derretido se recolectó en un vaso de precipitación de 20 ml. Posteriormente, el contenido se centrifugó a 300 gv durante 5 minutos, y la muestra resultante se resuspendió en el diluyente Botusemen-Special para los

análisis de calidad espermática. Este procedimiento de VIT-Pe se ejecutó conforme a los protocolos detallados por Consuegra (2019b).

3.2.5.4. Vitricación en pajuelas (VIT-Paj)

El semen fue ajustado a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml, utilizando el mismo diluyente complementado con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 100 mM de trehalosa (465 mOsm/kg). Después de un periodo de enfriamiento de una hora, las muestras se cargaron en pajuelas de 0,25 ml mediante una micropipeta, siendo insertadas horizontalmente en pajuelas de 0,5 ml. Posteriormente, ambos extremos de la pajuela de 0,5 ml fueron termosellados y sumergidos en una caja criogénica con nitrógeno líquido (NL2). Se vitrificaron un total de 48 pajuelas (3 pajuelas por eyaculado; 12 pajuelas por caballo). Para el proceso de calentamiento, las pajuelas se sumergieron en 3 ml de Botusemen-Special precalentado a 43°C hasta que la solución vitrificada se volvió líquida. El contenido fue centrifugado a 300 g durante 5 minutos y el pellet resultante se resuspendió en el mismo diluyente para llevar a cabo los análisis respectivos de la calidad espermática. Este procedimiento fue llevado a cabo siguiendo los protocolos establecidos por Consuegra (2019b).

3.3. Análisis de calidad espermática

3.3.1. Evaluación cinemática e integridad de membranas espermáticas

Las muestras espermáticas, tanto frescas como criopreservadas ya sea por Congelación Convencional (CC), Vitricación en pellets (VIT-Pe) o Vitricación en pajuelas (VIT-Paj), fueron sometidas a análisis cinemático utilizando el sistema computarizado CASA-SCA® (Evolution, 2018, Microptic, España). Se registraron diversos parámetros, incluyendo motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad curvilínea en progresión (VCL-R, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea en progresión (VSL-R, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batida del flagelo (Hz).

La evaluación de la integridad de las membranas espermáticas se llevó a cabo mediante la tinción de doble fluorescencia simultánea PI-PNA-FITC. Para cada muestra de cada protocolo, se realizó una dilución en 200 μL de HEPES (solución tampón) con una concentración promedio de 20×10^6 espermatozoides/ml. En condiciones de oscuridad, se añadió una mezcla de yoduro de propidio (PI) y la aglutinina FITC/PNA. Se procedió al análisis de cuatro subpoblaciones

espermáticas mediante conteo celular en un equipo de epifluorescencia (excitación: 450–490 nm y emisión: 520 nm), siguiendo los detalles proporcionados por Tamay et al., (2022). Las denominaciones son IPIA, membrana plasmática intacta y acrosoma intacto; IPDA, membrana plasmática y acrosoma dañados; DPIA, membrana plasmática dañada y acrosoma intacto; y DPDA, membrana plasmática dañada y acrosoma dañado.

3.3.2. Evaluación de las dimensiones morfométricas de la cabeza

El análisis de morfometría de la cabeza de los espermatozoides se llevó a cabo de manera automatizada utilizando el módulo ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*) dentro del mismo sistema CASA (SCA®), tanto en muestras frescas como en aquellas criopreservadas mediante los tres procedimientos. Se preparó un frotis para cada muestra colocando 10 μl de esperma en el extremo de un portaobjetos y extendiendo la gota con otro portaobjetos. Los frotis fueron dejados secar al aire y se aplicó la técnica de tinción SpermBlue® descrita por Galarza y sus colaboradores, así como por Van Der Horst & Marre y Galarza. (2021, 2010). Se analizaron 100 imágenes de cabezas por frotis para obtener las medidas morfométricas de los espermatozoides: largo (L, μm), ancho (W, μm), área (A, μm^2) y perímetro (P, μm).

3.4. Análisis Estadístico

Los datos derivados de las distintas evaluaciones espermáticas fueron analizados mediante el software STATISTICA v.12 para Windows (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Todos los datos paramétricos fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para verificar su distribución normal. Aquellos que no siguieron una distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* o *Log-10* (para porcentajes y valores numéricos, respectivamente) antes de realizar los análisis estadísticos. Un ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Bonferroni fueron usados para comparar las muestras frescas y criopreservadas de los tres tratamientos (CC, VIT-Pe y VIT-Paj) sobre la cinemática, integridad de membranas y dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides. Además, se incluyó el factor "reproductor" (caballo) como covariable en este análisis para tener en cuenta la variabilidad entre algunos caballos. El nivel de significancia se estableció en $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Cinemática

Los parámetros cinemáticos de los espermatozoides, ya sean frescos o criopreservados mediante congelación (CC), vitrificación en pajuelas (VIT-Paj) o en pellets (VIT-Pe), se presentan en las Figuras 2 a 5.

En los análisis de cinemática, se observó que el factor "reproductor" tuvo influencia en ciertos parámetros, como MP, VSL, VSL-R, STR, LIN, WOB y ALH, ya que se identificaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los caballos después del proceso de criopreservación.

En términos generales, los parámetros cinemáticos se vieron afectados por los procesos de congelación y vitrificación, independientemente de la técnica utilizada. Se observó una significativa reducción en los valores de motilidades, velocidades, STR y ALH, mientras que se registró un aumento significativo en SRT y LIN ($P < 0,05$) en comparación con los valores previos a la criopreservación (muestras frescas).

El tratamiento de congelación convencional (CC) resultó en porcentajes más elevados ($P < 0,05$) de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) en comparación con los tratamientos de vitrificación. Sin embargo, la vitrificación en pellets (VIT-Pe) logró una MT significativamente mayor ($P < 0,05$) que la vitrificación en pajuelas (VIT-Paj) (Figura 3).

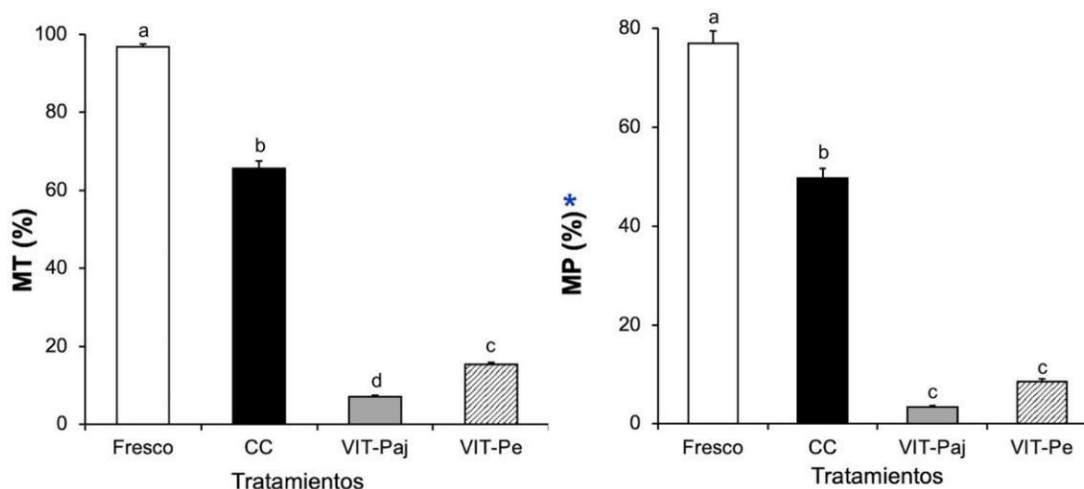


Figura 3. Motilidad total y progresiva de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets. Asterisco expresa diferencias significativas entre

caballos (* $P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas (a - b - c - d, $P < 0,05$; a - c, a - d, b - d, $P < 0,01$).

En el análisis de las velocidades espermáticas después de la criopreservación, se observó que los tratamientos CC y VIT-Pe exhibieron valores más elevados ($P < 0,05$) en VCL y VCL-R. Después del proceso de calentamiento, la vitrificación en pellets (VIT-Pe) generó espermatozoides con una velocidad rectilínea (VSL) significativamente mayor ($P < 0,05$) que la vitrificación en pajuelas (VIT-Paj). De manera efectiva, tanto el tratamiento de vitrificación en pellets (VIT-Pe) como en pajuelas (VIT-Paj) produjeron velocidades con trayectorias rectilíneas rápidas y progresivas (VCL-R) más elevadas ($P < 0,05$) que los espermatozoides sometidos a congelación convencional (CC) (Figura 4).

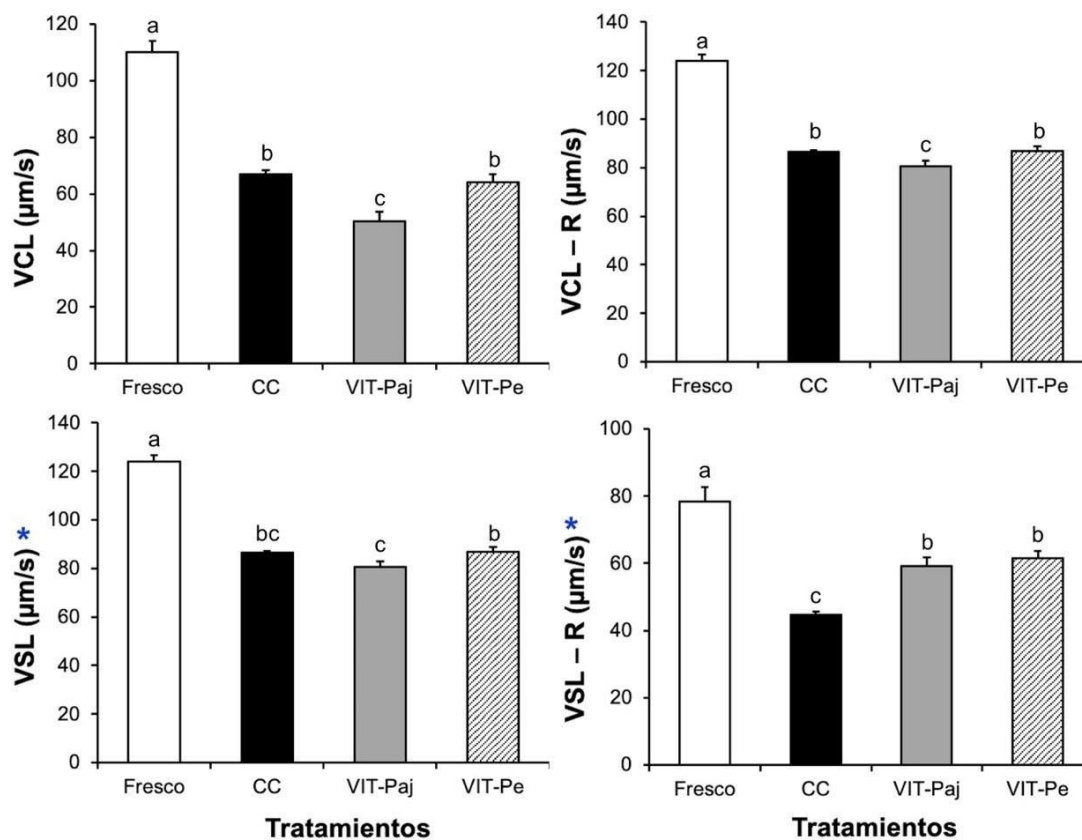


Figura 4. Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) con sus trayectorias rápidas progresivas (VCL-R y VSL-R) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets. Asterisco expresa diferencias significativas entre caballos (* $P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas (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 tanto en pajuelas como en pellets alcanzaron porcentajes superiores de rectitud (STR) y linealidad (LIN) posterior al calentamiento de los espermatozoides en comparación con sus muestras frescas. Los tratamientos CC y VIT-Pe obtuvieron porcentajes STR más altos ($P < 0,05$) que el tratamiento VIT-Paj. Por otro lado, ambos tratamientos de vitrificación produjeron porcentajes más altos de LIN que el tratamiento de congelación convencional. Finalmente, las muestras de espermatozoides antes de la congelación (frescas) y después de la vitrificación en pajuelas y pellets produjeron porcentajes más altos ($P < 0,05$) de oscilación (WOB) que aquellos espermatozoides congelados y descongelados (Figura 5).

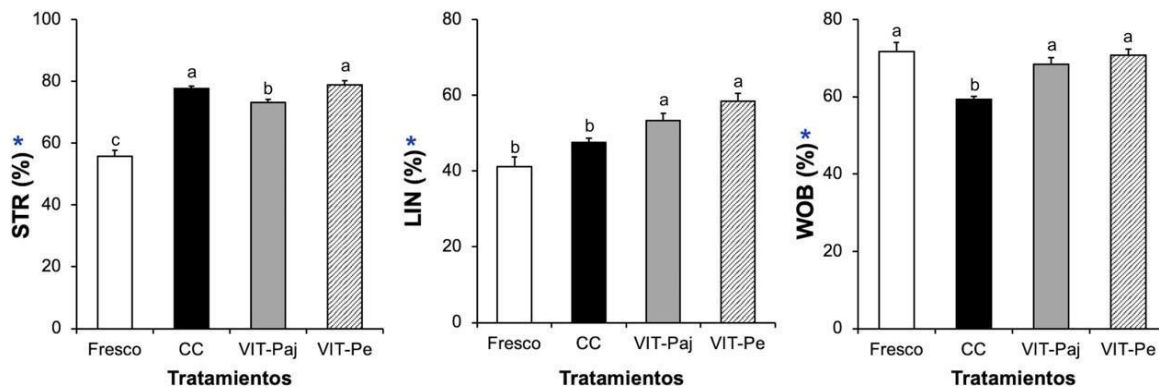


Figura 5. Rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets. Asterisco expresa diferencias significativas entre caballos (* $P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas (a – b, $P < 0,05$)

Los espermatozoides congelados convencionalmente (CC) y posteriormente descongelados mostraron valores superiores ($P < 0,05$) en términos de amplitud del desplazamiento lateral (ALH) y frecuencia de batido flagelar (BCF) en comparación con los espermatozoides vitrificados (ya sea en pellets o en pajuelas) y posteriormente calentados. Sin embargo, los espermatozoides vitrificados en pellets (VIT-Pe) exhibieron valores más altos ($P < 0,05$) de ALH y BCF que los espermatozoides vitrificados en pajuelas. De hecho, no se observaron diferencias significativas en BCF entre los espermatozoides frescos y las muestras vitrificadas en los respectivos pellets (Figura 6).

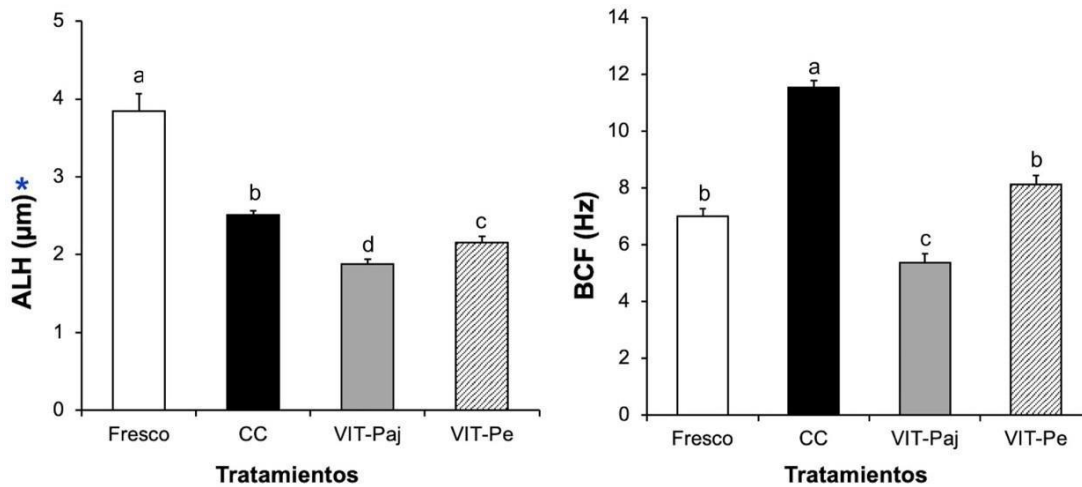


Figura 6. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets. Asterisco expresa diferencias significativas entre caballos (* $P < 0,05$). Letras diferentes en cada barra y en cada motilidad expresan diferencias significativas (a - b - c - d, $P < 0,05$; a - c, b - d, a - d, $P < 0,01$).

4.2. Integridad de membranas espermática post-criopreservación

El análisis post-criopreservación del estado de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos congelados (CC) y vitrificados tanto en pajuelas (VIT-Paj) como en pellets/pellets (VIT-Pe) se muestran en la Tabla 6.

La (CC) produjo mayores porcentajes ($P < 0,05$) de espermatozoides con integridad simultánea de la membrana plasmática y acrosomal (IPIA) y con integridad total de la membrana plasmática (Total IP) que aquellos tratamientos de vitrificación (VIT-Paj y VIT-Pe). No obstante, después de la vitrificación en pellets (VIT-Pe), se obtuvo mayores porcentajes ($P < 0,05$) de IPIA y Total IP que después de la vitrificación en pajuelas (VIT-Paj). En este mismo sentido, el tratamiento de vitrificación en pajuelas (VIT-Paj) produjo un mayor porcentaje indeseable ($P < 0,05$) de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma íntegro que los tratamientos de congelación (CC) y vitrificación en pellets (VIT-Pe). Ambos tratamientos de vitrificación (VIT-Paj y VIT-Pe) también produjeron un mayor porcentaje indeseable ($P < 0,05$) de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal dañadas (DPDA, degenerados) que el tratamiento de congelación. Finalmente, la integridad total de acrosoma fue mayor después de la congelación convencional que la vitrificación en pajuelas (Tabla 6).

Tabla 6. Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia (prueba PI / PNA-FITC) de espermatozoides equinos congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets.

Categoría de Fluorescencia	Tratamientos		
	CC	VIT-Paj	VIT-Pe
	(n = 45)	(n = 45)	(n = 45)
IPIA (%)	56,0 ± 1,84 ^a	15,9 ± 0,68 ^c	26,6 ± 1,49 ^b
IPDA (%)	0,84 ± 0,19	0,53 ± 0,09	0,47 ± 0,15
DPIA (%)	21,9 ± 1,26 ^c	57,8 ± 1,04 ^a	47,7 ± 2,49 ^b
DPDA (%)	21,2 ± 1,40 ^b	25,7 ± 0,78 ^a	25,1 ± 1,64 ^a
Total IP (%)	56,8 ± 1,88 ^a	16,4 ± 0,70 ^c	27,1 ± 1,53 ^b
Total IA (%)	77,9 ± 1,38 ^a	73,7 ± 0,84 ^b	74,4 ± 1,67 ^{ab}

IPIA, espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto; IPDA, espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado; DPIA, espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto; DPDA, espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. Letras diferentes en cada fila difieren significativamente entre tratamientos ^{a-b-c}, $P < 0,05$; $a - c$, $P < 0,01$.

4.3. Dimensiones morfométricas de la cabeza

El análisis de las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados convencionalmente y vitrificados, tanto en pajuelas (VIT-Paj) como en pellets (VIT-Pe), se presenta en la Tabla 7. Se observó que el factor "reproductor" influyó en algunas variables, como la anchura, área, rugosidad y regularidad, ya que se evidenciaron diferencias significativas entre los caballos ($P < 0,05$).

Ambos tratamientos de vitrificación incrementaron significativamente ($P < 0,05$) el largo, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides equinos después del proceso criogénico en comparación con sus valores referenciales de las muestras frescas. Asimismo, ambos tratamientos de vitrificación obtuvieron valores de la anchura y perímetro de la cabeza de los espermatozoides más altos ($P < 0,05$) que el tratamiento de congelación después de la criopreservación. Adicional a ello, el tratamiento de vitrificación en pajuelas (VIT-Paj) evidenció

un valor más alto ($P < 0,05$) del perímetro de la cabeza de espermatozoides equinos que el tratamiento de congelación.

Por otro lado, la regularidad se redujo significativamente ($P < 0,05$) después de todos los tratamientos de criopreservación. En este sentido, el tratamiento de VIT-Paj mostró una menor rugosidad en comparación con los tratamientos CC y VIT-Pe. Finalmente, el tratamiento VIT-Paj aumentó significativamente ($P < 0,05$) la regularidad de la cabeza de los espermatozoides equinos después del proceso criogénico.

Tabla 7. Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets.

Dimensiones de la cabeza	Tratamientos			
	Fresco	CC	VIT-Paj	VIT-Pe
Largo (μm)	5,82 \pm 0,01 ^c	6,09 \pm 0,06 ^b	6,35 \pm 0,05 ^a	6,2 \pm 0,04 ^{ab}
Anchura (μm) *	2,97 \pm 0,02 ^{ab}	2,93 \pm 0,04 ^b	3,02 \pm 0,05 ^a	3,03 \pm 0,05 ^a
Área (μm^2) *	19,0 \pm 0,18 ^b	19,3 \pm 0,24 ^{ab}	20,3 \pm 0,29 ^a	20,2 \pm 0,37 ^a
Perímetro (μm)	12,8 \pm 0,04 ^c	13,2 \pm 0,09 ^b	13,8 \pm 0,08 ^a	13,5 \pm 0,11 ^{ab}
Elipticidad	1,97 \pm 0,01	2,1 \pm 0,05	2,13 \pm 0,04	2,06 \pm 0,03
Elongación	0,32 \pm 0,00	0,35 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01
Rugosidad *	1,46 \pm 0,01 ^a	1,39 \pm 0,01 ^b	1,34 \pm 0,01 ^c	1,39 \pm 0,01 ^b
Regularidad *	0,73 \pm 0,00 ^b	0,74 \pm 0,01 ^{ab}	0,75 \pm 0,00 ^a	0,74 \pm 0,00 ^{ab}

Letras diferentes en cada fila difieren significativamente entre tratamientos ^{a - b - c}, $P < 0,05$. Asterisco representa diferencias significativas entre caballos * $P < 0,05$.

En la Figura 7 se ilustra el tamaño de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados en pajuelas y pellets. En general, se denota que la mayoría los espermatozoides vitrificados se ubican en un área superior a los espermatozoides frescos y los congelados convencionalmente (ver línea de tendencia). Nótese un mayor incremento del área y la longitud de la cabeza en espermatozoides vitrificados en pellets (rojos) y pajuelas (plomos).

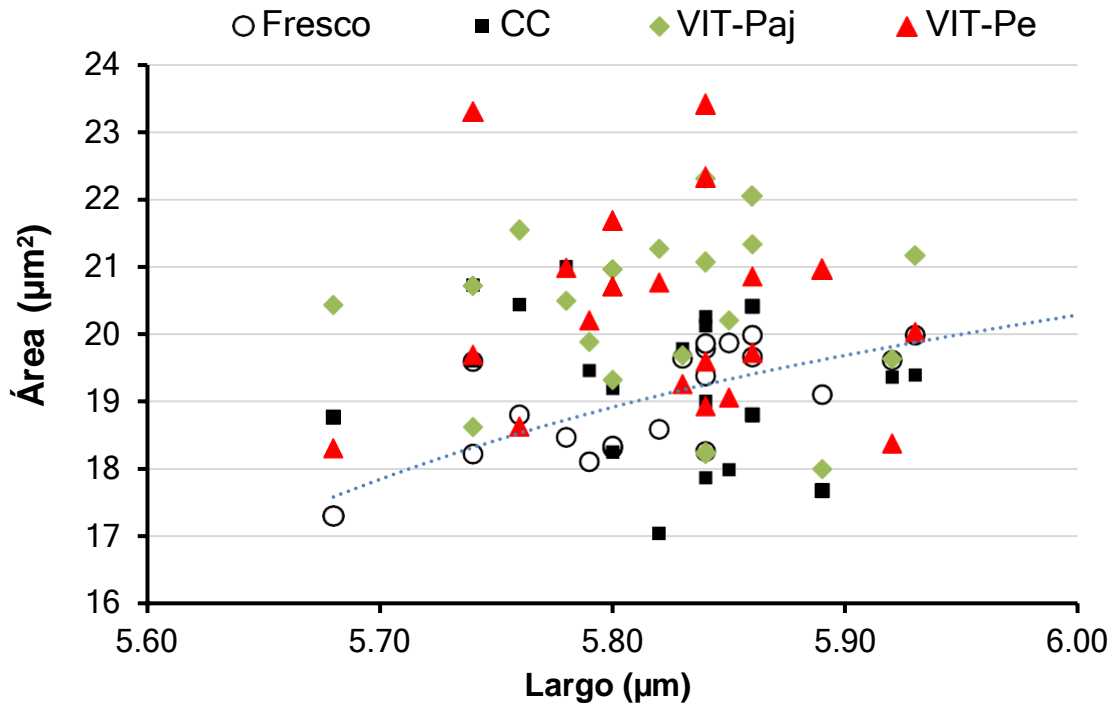


Figura 7. Comparación de la morfometría de la cabeza de espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados tanto en pajuelas como en pellets. Los datos corresponden a la relación entre el área de la cabeza del espermatozoides (μm^2) y la longitud (μm), medida en 100 espermatozoides / muestra ($n = 20$) / tratamiento (total 2000 espermatozoides /tratamiento). La línea azul entrecortada representa la tendencia exponencial del área y largo de espermatozoides frescos

5. Discusión

Esta investigación examinó la criosupervivencia de espermatozoides equinos congelados convencionalmente y vitrificados mediante pellets y pajuelas de 0,25 ml. Los resultados revelaron que, en general, la congelación convencional produjo una mejor cinemática e integridad de membranas espermáticas post-criopreservación que las vitrificaciones. Tanto la congelación convencional como la vitrificación en pellets o pajuelas, redujeron significativamente la motilidad, velocidades, STR y ALH comparados con sus valores referenciales en fresco. Además, el factor "reproductor" influyó en la cinemática y morfometría, y en términos de integridad de membranas, la congelación convencional destacó por encima de ambas técnicas de vitrificación.

La criopreservación somete a las células a un estrés osmótico, generado por las bajas temperaturas y los desequilibrios osmóticos. Del mismo modo, los ACP también generan estrés celular. No obstante, se ha registrado que la DMF ocasiona un menor daño osmótico debido a su menor peso molecular y viscosidad (Alvarenga et al., 2016; Pérez. et al., 2017). Según Ugur et al., (2019), la criopreservación no solo afecta morfométricamente, sino que también impacta el movimiento del espermatozoide, cuyo análisis se realiza comúnmente mediante el sistema CASA, permitiendo la evaluación de diversas variables para determinar la cinemática celular. Además, se observa una variabilidad significativa en los resultados de la criopreservación entre especies debido a las diferencias en la resistencia del espermatozoide a los procesos de congelación y descongelación. En el ganado bovino, como resultado de la criopreservación, se registra una reducción gradual de hasta un 50% en la motilidad y viabilidad después de la descongelación. En cerdos, la disminución de la viabilidad es comparable a la de los bovinos, oscilando entre un 50% y un 60% (Roca et al., 2006). En ovinos, se observa una menor motilidad y viabilidad post-descongelación en comparación con las especies mencionadas anteriormente, con alrededor del 30% al 40% de reducción (García et al., 2017). En caballos, los resultados son menos favorables en comparación con otros animales de granja, como bovinos, cerdos y ovinos, con un 30% de motilidad y viabilidad después de la descongelación (Catalán et al., 2020). Los hallazgos de este estudio son consistentes con los mencionados anteriormente indicando que los parámetros cinemáticos se vieron afectados drásticamente, independientemente del proceso de criopreservación.

Para la CC, se escogió a la DMF 5% porque los hallazgos que obtuvo Squires et al., (2004). Con una concentración al 5% de DMF proporcionó una mejor motilidad y viabilidad a los espermatozoides que el tratamiento con un 2 % de DMF.

En una investigación realizada por Pérez-Marín et al., (2018) se evaluó el efecto de los diluyentes a base de trehalosa y sacarosa sobre la calidad del espermatozoide después de la vitrificación. Los resultados obtenidos indicaron que, pesar de las diferentes concentraciones de trehalosa y sacarosa tanto el acrosoma como las membranas plasmáticas se vieron gravemente afectados, disminuyendo drásticamente la integridad y viabilidad. Sin embargo, este estudio también reveló que se mantuvo estructura del ADN. Estos resultados poco favorables guardan similitud con los del presente estudio al durante los procesos de vitrificación. No obstante, estudios como los realizados por Consuegra et al. (2019b) mostraron resultados satisfactorios con el uso de estos disacáridos en cuanto a integridad de membrana. Estos hallazgos sugieren que, si bien la trehalosa puede tener beneficios en términos de protección de la membrana espermática, la concentración óptima y las condiciones específicas de aplicación pueden variar incluso dentro de la misma especie, así como también dependen del método de procesamiento del semen.

La CC se considera una opción más segura para preservar la integridad de los espermatozoides durante el proceso de enfriamiento, ya que permite un control más preciso de la velocidad de descenso de la temperatura. Este enfoque contrasta con la vitrificación, que emplea un proceso de enfriamiento ultrarrápido (Aizpurua et al., 2017; Isachenko et al., 2008). La diferencia en la velocidad de enfriamiento entre estos métodos podría explicar los resultados observados en nuestro estudio, donde la congelación convencional demostró un desempeño superior en términos de movilidad total y progresiva en comparación con ambos métodos de vitrificación.

En nuestro estudio, observamos que los parámetros cinemáticos del espermatozoide se vieron afectados independientemente de la técnica utilizada. La CC mostró porcentajes más altos de MT y MP en comparación con los tratamientos de vitrificación, la VIT-Pe logró una MT significativamente mayor ($P < 0,05$) que la VIT-Paj. Por otro lado, el estudio realizado por Consuegra et al. (2019b) evaluó diferentes concentraciones de espermatozoide para la vitrificación en pajuelas, incluyendo concentraciones de 50, 100 y 200 x 10⁶ spz/ml. Sus resultados mostraron que las pajuelas con una concentración final de 100 x 10⁶ spz/ml tuvieron valores más altos de MT, MP, VCL, VSL y VAP en comparación con los otros grupos de tratamiento. Estos hallazgos sugieren que, aunque la vitrificación en pajuelas con una concentración de 50 x 10⁶ spz/ml mostró una MT significativamente menor en nuestro estudio, la investigación de Consuegra et al. (2019b) sugiere que el aumento de concentración de espermatozoide puede mejorar la motilidad espermática durante la vitrificación en pajuelas.

Un factor más que podría influir en los resultados de la calidad del esperma, es su concentración tras la dilución. Los hallazgos revelaron que los tratamientos en los que el semen se diluyó a una concentración baja tuvieron una menor integridad inicial de MT, MP e integridad de la membrana plasmática, un fenómeno conocido como "efecto de dilución" del semen (Hayden et al., 2015; Restrepo et al., 2019).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre los diferentes apartados de la cinemática espermática, revelan un impacto significativo de las técnicas de criopreservación, reflejando hallazgos consistentes con investigaciones previas. Se observó una disminución en varios parámetros, incluyendo VCL, VCL-RAP, VSL, VSL-RAP y ALH, en comparación con las muestras frescas. Esta disminución se alinea con los hallazgos de Tamay et al., (2022), quienes encontraron resultados parecidos en la cinemática de los espermatozoides de caballos después de la criopreservación. La comparativa con los estudios hechos en humanos y otros animales, refuerza aún más estos hallazgos, destacando algunas complicaciones de la criopreservación en la motilidad y viabilidad espermática. Los estudios de Tamburrino et al., (2023) en humanos y Amón y Jaramillo, (2023) en toros, respaldan la idea de los daños inducidos en la vitrificación de espermatozoides.

Es importante señalar que, aunque se observaron diferencias significativas entre algunas técnicas de criopreservación, como se evidenció en los resultados de VSL-R, LIN y WOB entre VIT-Paj y CC, no se encontraron diferencias significativas en los mismos hallazgos entre ambos métodos de vitrificación. Esto sugiere que la elección de la técnica de criopreservación puede influir en ciertos aspectos de la cinética espermática, pero puede no ser el único factor determinante.

Los diferentes datos que nos otorga el CASA sobre los parámetros cinemáticos, respecto a la velocidad, son importantes porque con ello se relaciona el paso de los espermatozoides por el tracto genital de la hembra, siendo una correlación positiva cuando estos valores son óptimos. Del mismo modo, valores de LIN y BCF altos, permiten un mejor transporte y penetración en el moco cervical (Mortimer, 2000; Robayo et al., 2008; Verstegen et al., 2002).

Por otro lado, recordando que la membrana del espermatozoide está compuesta principalmente por una bicapa lipídica, como fosfolípidos y colesterol, así como por diversas proteínas (Mocé et al., 2010), por lo que su protección es importante. Sin embargo, detrás de todos los esfuerzos que se han realizado para que los protocolos de congelación o vitrificación tengan éxito, las bajas temperaturas juegan un papel negativo y causan lesiones en los espermatozoides, pues su

calidad depende básicamente en su capacidad para soportar cambios de temperatura sin que lleguen a perder sus funciones principales (Sieme et al., 2008). Esto repercute en la calidad e integridad de la membrana plasmática y acrosomal, causando lesiones irreversibles debido a alteraciones en los complejos lípido-proteína durante la congelación y descongelación (Loomis y Graham, 2008). A pesar de todo esto, la adición de crioprotectores es clave para conservación del esperma equino. La trehalosa es un disacárido utilizado con el fin de proteger los espermatozoides de las bajas temperaturas, porque tiene la capacidad de equilibrar la presión osmótica durante la congelación y mejorar la temperatura de transición vítrea, evitando así la formación de hielo. Cambia la fluidez de la membrana de los espermatozoides, incorporándose a los fosfolípidos, produciendo membranas más estables durante el procedimiento de congelación (Aboagla y Terada, 2004; PAN et al., 2017).

La integridad de la membrana plasmática es esencial para las funciones específicas del espermatozoide que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante para lograr la fecundación. Por lo tanto, su evaluación en los procesos de criopreservación es crucial ya que la congelación y descongelación la afecta significativamente, lo que resulta en una disminución de la viabilidad y vitalidad espermática posterior al proceso de descongelación (Rubio-Guillén et al., 2009). Nuestro estudio mostró que la CC preservó mejor la integridad de la membrana plasmática y acrosomal IPIA en comparación con los procesos de vitrificación, sin embargo, dentro de los métodos de vitrificación, se observó que la VIT-Pe tuvo mejores resultados en términos de IPIA en comparación con la VIT-Paj, con valores del 26,6% y el 15,9% respectivamente. Un estudio realizado por (Restrepo et al., 2019) comparó la CC y la VIT-Pe, los resultados indicaron que la CC tiene un mejor mantenimiento del potencial de la membrana plasmática (21,82%) en comparación con VIT-Pe (5,32%), lo que resalta las diferencias en el impacto de estos métodos en la integridad de la membrana. Además, es importante destacar que el proceso de enfriamiento ultrarrápido utilizado en VIT-Paj puede ser potencialmente dañino para la integridad de las membranas, lo que podría explicar los resultados inferiores en comparación con la VIT-Pe y CC.

La integridad de membranas también está relacionada con la concentración de disacáridos utilizados en los procesos de criopreservación de los espermatozoides. Compuestos como la trehalosa y la sacarosa han demostrado tener beneficios en la criopreservación del semen equino, ya que ayudan a proteger a las células del estrés oxidativo y mejorar la viabilidad y función del esperma después del proceso de Pérez-Marín et al., (2018). Parece que la trehalosa es más eficaz que la sacarosa para proteger la membrana del esperma ya que

estabiliza la bicapa de la membrana plasmática inhibiendo la formación de cristales de hielo y formando enlaces de hidrógeno con los fosfolípidos de la membrana durante el proceso de criopreservación (Vafaei et al., 2019). Un estudio realizado por Álvarez et al., (2019) demostró que la trehalosa a una concentración de 150mM resulta como una alternativa beneficiosa para el almacenamiento a largo plazo de muestras de esperma epididimario; sin embargo, las muestras de esperma provenientes de eyaculado presentaron menor índice de viabilidad cuando eran almacenadas con este disacárido. Por otro lado, según Arando Arbulu, (2019), el uso de la sacarosa en una concentración de 200mM ha demostrado una funcionalidad favorable de la membrana plasmática en aquellas muestras de espermatozoides congelados y vitrificados, con un 40% de mejora. En el presente estudio se emplearon 100mM de trehalosa y se utilizaron muestras provenientes de eyaculado; por lo tanto, es importante destacar que la elección del disacárido también ejerce influencia en este aspecto y deben su uso debe ser evaluado según las características de las muestras.

Las dimensiones morfométricas de la cabeza del espermatozoide, es una evaluación importante ya que es un indicador de criosupervivencia espermática (Gravance et al., 1998), pero pueden verse afectadas por varios factores, entre ellos, siendo la criopreservación y el estrés osmótico un claro ejemplo (O'Brien et al., 2019). También, Waheed et al., (2015), señala que la morfometría espermática puede verse afectada de forma significativa ($P < 0,001$) debido a la estación del año por la variabilidad de las temperaturas, la edad, capacidad fertilizante y características independientes de cada semental. En un estudio en donde se evalúa la morfometría de los espermatozoides, se señala que incluso dentro de un mismo semental, las muestras tomadas en diferentes días y horarios pueden variar debido a las diferencias de temperatura durante la recolección, transporte y la preparación de las muestras (Phetudomsinsuk et al., 2008), siendo congruente con la idea de que diferentes aspectos en la morfometría de la cabeza del espermatozoide equino, responde a individualidades. Buzón Cuevas, (2014) obtuvo resultados similares a los nuestros en diferencias de semen fresco entre caballos de distintas razas, sugiere que las características morfométricas de los reproductores son intrínsecas a cada individuo. Esto respalda la influencia del factor "reproductor" en las muestras frescas obtenidas de caballos dentro de nuestro estudio, donde se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$). Un estudio logró determinar que aquellos sementales de alta capacidad fertilizadora presentaron un menor perímetro de la cabeza espermática en comparación con aquellos de baja fertilidad (Casey et al., 1997).

Nuestro estudio tuvo diferencias significativas en el largo, área y perímetro de la cabeza del espermatozoide en los dos métodos de vitrificación en comparación con las muestras frescas. Arruda et al., (2002 y Cerdeira et al., (2020) evaluaron los efectos de la criopreservación sobre las variables morfométricas del espermatozoide equino, pues concluyó que la CC tendió a disminuir las dimensiones de la cabeza del espermatozoide y la vitrificación la aumentó. Una posible respuesta a ese efecto es que hubo descondensación de la cromatina y las ampollas de la membrana plasmática en la región de la cabeza, aumentando las dimensiones de esa zona, la cual fue detectada por el sistema CASA. Contrario a esto, en caprinos indican que la congelación del semen no afecta las dimensiones generales de las cabezas de espermatozoide, sin embargo, esto también depende del método usado (Gravance et al., 1997; Hidalgo et al., 2007).

La discrepancia entre nuestros hallazgos y los de Cerdeira et al., (2020) en la morfometría espermática canina posterior a la criopreservación. Mientras que en su estudio se observó que la vitrificación tendía a aumentar el tamaño de la cabeza del espermatozoide y la CC mostraba una tendencia a reducirlo, en nuestro caso se evidenció un incremento generalizado en el tamaño de la cabeza del espermatozoide tanto en la vitrificación como en la congelación convencional.

Conclusiones

En conclusión, nuestros resultados destacan que la congelación convencional suplementado con DMF al 5%, proporciona una mejor viabilidad y funcionalidad en comparación con los procesos de vitrificación, independientemente del método utilizado. Además, se observó que la CC presenta una mayor integridad de membranas en comparación con la vitrificación en pellets, aunque esta última mostró mejores resultados que la vitrificación en pajuelas. También se evidenció un incremento en las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides en ambos procesos de criopreservación en comparación con las muestras frescas.

Recomendaciones

- Brindar la técnica de criopreservación más eficaz, priorizando la cinemática general de la muestra, la congelación convencional CC es el método preferido, sin embargo, el uso de la vitrificación no deja de ser un método novedoso y con resultados favorables.
- Evaluar el método de vitrificación que se desea realizar, recordando que al utilizar el método de vitrificación en pellets (VIT-Pe) nos brinda mejores resultados en términos de integridad de membranas en comparación con vitrificación con pajuelas (VIT-Paj).
- Considerar la variabilidad de la muestra entre reproductores, teniendo en cuenta que influye tanto en cinemática como en morfometría de la cabeza del espermatozoide. Es posible que, entre individuos, respondan diferente a cada método de criopreservación lo cual puede llegar a influir en los resultados.

Referencias

- Aboagla, E. M. E., y Terada, T. (2004). Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(5), 809-818. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.12.003>
- Agarwal, A., y Tvrda, E. (2017). *Chapter 5 Slow Freezing of Human Sperm BT - Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos: Methods and Protocols* (Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (eds.); pp. 67-78). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6828-2_5
- Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M. A., y Gómez-Torres, M. J. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction*, 32(10), 2007-2015. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex281>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., y Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 521-530. <https://doi.org/10.1016/J.CVEQ.2016.08.003>
- Álvarez, C., González, N., Luño, V., y Gil, L. (2019). Ejaculated compared with epididymal stallion sperm vitrification. *Animal Reproduction Science*, 211, 106205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106205>
- Amann, R. P., y Graham, J. K. (2011a). Spermatogenesis. En *Equine Reproduction*. Wiley.
- Amann, R. P., y Graham, J. K. (2011b). Spermatozoal Function. En *Equine Reproduction* (pp. 1053-1084). Wiley.
- Amann, R. P., y Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145-173. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Amón, N. A., y Jaramillo, J. A. (2023). *Efecto del resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados*. Universidad de Cuenca.
- Arando Arbulu, A. (2019). *Nuevas estrategias para la criopreservación de esperma ovino mediante el uso de antioxidantes, gradientes y vitrificación*. Universidad de Córdoba.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., y Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 77-81. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00700-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00700-6)
- Arruda, R. P., Ball, B. A., Gravance, C. G., Garcia, A. R., y Liu, I. K. M. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, 58(2-4), 253-256. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00858-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00858-0)
- Athurupana, R., Takahashi, D., Ioki, S., y Funahashi, H. (2015). Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *The Journal of reproduction and development*, 61(3), 205–210. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-152>
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., y Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682-1699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>

- Brito, L. F. C. (2007). Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249-264. <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2007.09.004>
- Buzón Cuevas, A. (2014). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer*. Universidad de Córdoba.
- Casey, P. J., Gravance, C. G., Davis, R. O., Chabot, D. D., y Liu, I. K. M. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 47(2), 575-582. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00015-0)
- Catalán, J., Llavanera, M., Bonilla-Correal, S., Papas, M., Gacem, S., Rodríguez-Gil, J. E., Yeste, M., y Miró, J. (2020). Irradiating frozen-thawed stallion sperm with red-light increases their resilience to withstand post-thaw incubation at 38 °C. *Theriogenology*, 157, 85-95. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.07.027>
- Cerdeira, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Pérez-Gutiérrez, J. F., Híjon, M., Castaño, C., y Santiago-Moreno, J. (2020). Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. *Cryobiology*, 95, 164-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.007>
- Consuegra, C., Crespo, F., Bottrel, M., Ortiz, I., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., y Hidalgo, M. (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 191, 85-91. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.02.013>
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Arenas, R., Morrell, J. M., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.017>
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., y Hidalgo, M. (2019a). Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal Reproduction Science*, 206, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.009>
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., y Hidalgo, M. (2019b). Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal Reproduction Science*, 206, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.009>
- Cupps, P. (1991). Spermatogenesis. En *Reproduction in Domestic Animals* (4a ed., pp. 173-219). ACADEMIC PRESS, INC.
- Daramola, J. O., Adekunle, E. O., Iyasere, O. S., Oke, O. E., Sorongbe, T. A., Iyanda, O. A., Kehinde, A. R., Aluko, S. P., Olaoye, I. O., Gbadebo, O. E., Falolu, L. I., Olukayode, E. O., Ajayi, R. A., Enikannaye, O. J., y Osunjaiye, E. D. (2016). Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extendors on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Ruminant Research*, 136, 208-213. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2016.02.004>
- Davis, R. O., Gravance, C. G., y Casey, P. J. (1993). Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *American journal of veterinary research*, 54(11), 1808-1811.

- Deng, L., Duan, H., Zhang, X., Zeng, S., Wu, C., y Han, G. (2014). Advances in the Research and Application of Artificial Insemination to Equids in China: 1935-2012. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(3), 351-359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.07.010>
- 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., y Hidalgo, M. (2018). Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 189, 103-109. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.12.013>
- Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Bottrel, M., Ortiz, E., y Hidalgo, M. (2018). Vitrification in straws conserves motility features better than spheres in donkey sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(S2), 56-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.13256>
- Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Partyka, A., Dorado, J., y Hidalgo, M. (2017). Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(S4), 55-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.13057>
- Ferrer, M. S., Canisso, I. F., Ellerbrock, R. E., Podico, G., Lister, B. N., Hurley, D. J., Kline, K., y Palomares, R. A. (2020). Optimization of cryopreservation protocols for cooled-transported stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 221, 106581. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106581>
- Flesch, F. M., Voorhout, W. F., Colenbrander, B., van Golde, L. M. G., y Gadella, B. M. (1998). Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa: A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity1. *Biology of Reproduction*, 59(6), 1530-1539. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1530>
- Foster, M. L., Love, C. C., Varner, D. D., Brinsko, S. P., Hinrichs, K., Teague, S., LaCaze, K., y Blanchard, T. L. (2011). Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology*, 76(2), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.012>
- Gacem, S., Bompard, D., Valverde, A., Catalán, J., Miró, J., y Soler, C. (2020). Optimal frame rate when there were stallion sperm motility evaluations and determinations for kinematic variables using CASA-Mot analysis in different counting chambers. *Animal Reproduction Science*, 223, 106643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106643>
- Galarza, D., Duma, M., Samaniego, J. X., Soria, M., y Méndez, S. (2023). *Cryopreservation of Domestic and Wild Animal Spermatozoa: Update of Knowledge* (D. A. R. Silva & D. A. F. Pereira (eds.); p. Ch. 17). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.111918>
- Galarza, D., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Taboada, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., y Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15-21. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2021.10.002>
- Galarza, D., Serpa, V., y Torres, C. (2016). Comparación de dos medios para congelar semen de toro y la influencia de tres tiempos de equilibración en la calidad post-descongelación. *Maskana*, 6(Supl.), 189-190.

- García, W., Tabarez, A., y Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction*, 14(4), 1124-1132. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR916>
- Gordon, I. (2017). Introduction. 1.4. Factors Influencing Male Fertility. En *Reproductive Technologies in Farm Animals, 2nd Edition*. CABI.
- Govaere, J. L. J., Hoogewijs, M. K., De Schauwer, C., De Vlieghe, S., Van Soom, A., Duchateau, L., y de Kruif, A. (2014). Effect of Artificial Insemination Protocol and Dose of Frozen/Thawed Stallion Semen on Pregnancy Results in Mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(3), 487-491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.12316>
- Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3), 239-247. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00160-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00160-9)
- Graham, J. K. (2011). Principles of Cryopreservation. En *Equine Reproduction* (p. 2959). Wiley. <https://doi.org/9780470961872>
- Gravance, C. G., VISHWANATH, R., PITT, C., GARNER, D. L., y CASEY, P. J. (1998). Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. *Journal of Andrology*, 19(6), 704-709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02079.x>
- Gravance, C. G., White, C., Robertson, K. R., Champion, Z. J., y Casey, P. J. (1997). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Animal Reproduction Science*, 49(1), 37-43. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00053-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00053-5)
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., y Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Hammerstedt, R. O. Y. H., Graham, J. K., y Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>
- Hayden, S. S., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Hinrichs, K., y Love, C. C. (2015). The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology*, 83(4), 772-777. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.11.012>
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Ortiz, I., Pereira, B., Sanchez, R., y Crespo, F. (2018a). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, 196(April), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.022>
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Ortiz, I., Pereira, B., Sanchez, R., y Crespo, F. (2018b). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, 196, 91-98. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.06.022>
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., y Dorado, J. M. (2007). The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction*

Science, 100(1), 61-72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.003>

Holt, W. V., y Penfold, L. M. (2014). Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. En *Animal andrology: theories and applications*. (pp. 78-81). CABI Books. <https://doi.org/10.1079/9781780643168.0076>

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., y Nawroth, 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. M., Kreienberg, R., Katkov, I. I., Schulz, M., Lulat, A. G.-M. I., Risopatrón, M. J., y Sánchez, 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>

Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Mallmann, P., Rahimi, G., Sterzik, K., Sanchez, R., Risopatron, J., Damjanoski, I., y Isachenko, E. (2011). Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume: a novel technology. *Clinical Laboratory*, 57(9-10), 643-650.

Isachenko, V., Rahimi, G., Mallmann, P., Sanchez, R., y Isachenko, E. (2017). Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. *Andrology*, 5(6), 1055-1063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/andr.12414>

Jasko, D. J., Lein, D. H., y Foote, R. H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(3), 389-394.

Jhamb, D., Talluri, T. R., Sharma, S., Juneja, R., Nirwan, S. S., Yadav, D., Pargi, K. K., Tanwar, A., Kumar, P., Kumar, R., Mehta, S. C., Parashar, M., y Gaur, M. (2023). Freezability and Fertility Rates of Stallion Semen Supplemented With Trehalose in Lactose Extender. *Journal of Equine Veterinary Science*, 126, 104293. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2023.104293>

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., y Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85-90. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2015.05.004>

Katkov, I. I., Bolyukh, V. F., Chernetsov, O. A., Dudin, P., Grigoriev, A. Y., Isachenko, V., Isachenko, E., Lulat, A. G.-M. I., Moskovtsev, S., Petrushko, M. P., Pinyaev, V. I., Sokół, K., Sokol, Y. I., Sushko, A., y Yakhnenko, I. (2012). *Kinetic Vitrification of Spermatozoa of Vertebrates: What Can We Learn from Nature?*

Kířková, J., Čoudková, V., y Maršálek, M. (2017). Computer-Assisted Sperm Analysis of Head Morphometry and Kinematic Parameters in Warmblood Stallions Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 57, 8-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.012>

Loomis, P. R., y Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 119-128.

<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2007.11.010>

- McKinnon, A. O., y Voss, J. L. (1993). Equine reproduction. En *TA - TT* -. Lea & Febiger Philadelphia. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/24247046>
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., y Graham, J. K. (2010). Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(SUPPL. 2), 57-66. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2010.01635.X>
- Morel, D. (1999). *Equine Artificial Insemination*. CABI Pub.
- Morel, D. (2020). *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. CABI.
- Mortimer, D. (2000). Sperm Preparation Methods. *Journal of Andrology*, 21(3), 357-366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03390.x>
- Munroe, G. (2019). *Equine Clinical Medicine, Surgery and Reproduction* (G. Munroe (ed.); 2a ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429113680>
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., y Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160-167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
- Oldenhof, H., Bigalk, J., Hettel, C., de Oliveira Barros, L., Sydykov, B., Bajcsy, Á. C., Sieme, H., y Wolkers, W. F. (2017). Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking*, 15(5), 422-431. <https://doi.org/10.1089/bio.2017.0061>
- PAN, C. ying, YU, S., ZHANG, P. fei, WANG, B., ZHU, Z. dong, LIU, Y. ying, y ZENG, W. xian. (2017). Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(5), 1120-1129. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61489-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61489-2)
- Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A., y Gandini, L. (2014). *Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure BT - Genetic Damage in Human Spermatozoa* (E. Baldi & M. Muratori (eds.); pp. 137-150). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9_9
- Peña, F. J., Macías García, B., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., y Ortega Ferrusola, C. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76(7), 1177-1186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>
- Pérez-Marín, C. C., Requena, F. D., Arando, A., Ortiz-Villalón, S., Requena, F., y Agüera, E. I. (2018). Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology*, 80, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.002>
- Pérez Q., D. D., Acosta L., M., Restrepo B., G., Camacho, C., y Pérez O., J. (2017). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(4), 918-927. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13884>

Pesch, S., y Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability,

- fertility and cryopreservation. En *Micron* (Vol. 37, Número 7, pp. 597-612). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>
- Phetudomsinsuk, K., Sirinarumitr, K., Laikul, A., y Pinyopummin, A. (2008). Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-41>
- Pradiee, J., Estes, M. C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J. A., Urrutia, B., y Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84(9), 1513-1522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.036>
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., y Rodríguez-Gil, J. E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59(9), 1973-1990. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01297-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01297-9)
- Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., y 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., y 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00920.x>
- Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J. M., y Martínez, E. A. (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival1. *Journal of Animal Science*, 84(10), 2692-2699. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-094>
- Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., y González Villalobos, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros . En *Revista Científica* (Vol. 19, pp. 382-389). scielon .
- Samper, J. C. (2008). *Equine breeding management and artificial insemination*. Elsevier Health Sciences.
- Sanchez, R., Isachenko, V., Petrunkina, A. M., Risopatron, J., Schulz, M., y Isachenko, E. (2012). Live Birth After Intrauterine Insemination With Spermatozoa From an Oligoasthenozoospermic Patient Vitrified Without Permeable Cryoprotectants. *Journal of Andrology*, 33(4), 559-562. <https://doi.org/https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014274>
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J. V., Isachenko, V., y Isachenko, E. (2012). Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at -86 °C. *Andrologia*, 44(6), 433-435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01314.x>
- Schulz, M., Risopatrón, J., Uribe, P., Isachenko, E., Isachenko, V., y Sánchez, R. (2020). Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*, 8(6), 1642-1650. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/andr.12847>
- Sieme, H., Harrison, R. A. P., y Petrunkina, A. M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4),

276-292. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.05.001>

- Sieme, H., Töpfer-Petersen, E., Bader, H., Petzoldt, R., y Merkt, H. (2001). A.I.-sperm of the stallion: Evaluation criteria and minimal standards - A survey. *Pferdeheilkunde*, 17(2), 145-154. <https://doi.org/10.21836/pem20010208>
- Slabbert, M., du Plessis, S. S., y Huyser, C. (2015). Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, 47(5), 594-599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/and.12307>
- Squires, E. L., Keith, S. L., y Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.12.024>
- Stout, T. A. E., y Colenbrander, B. (2011). Reproductive parameters of draft horse, fresian and warmblood stallions. En *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 1362-1366). Wiley-Blackwell.
- Tamay, E., Palacios, P., Peláez, G., Saa, L. R., Dorado, J., Santiago-Moreno, J., y 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*. <https://doi.org/10.1089/bio.2022.0097>
- Tamburrino, L., Traini, G., Marcellini, A., Vignozzi, L., Baldi, E., y Marchiani, S. (2023). Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054656>
- Tischner, M. (1979). Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 27, 53-59.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., y Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Vafaei, F., Kohram, H., Zareh-Shahne, A., Ahmad, E., y Seifi-Jamadi, A. (2019). Influence of Different Combinations of Permeable and Nonpermeable Cryoprotectants on the Freezing Capacity of Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 69-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.01.014>
- van der Horst, G., y Maree, L. (2010). SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(6), 299-308. <https://doi.org/10.3109/10520290902984274>
- Varner, D. D. (2007). From A Sperm's Eye View - Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 53, 104-177.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., y Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)
- Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., y Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48(6), 907-917.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00319-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00319-1)

- Waheed, M. M., Ghoneim, I. M., y Abdou, M. S. S. (2015). Morphometric Characteristics of Spermatozoa in the Arabian Horse With Regard to Season, Age, Sperm Concentration, and Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(3), 244-249. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2015.01.005>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.007>
- 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>
- Zachariassen, K. E., y Kristiansen, E. (2000). Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. *Cryobiology*, 41(4), 257-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2289>
- Zhu, W.-J., y Li, J. (2015). A simple sperm nuclear vacuole assay with propidium iodide. *Andrologia*, 47(7), 779-785. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/and.12328>

Anexos



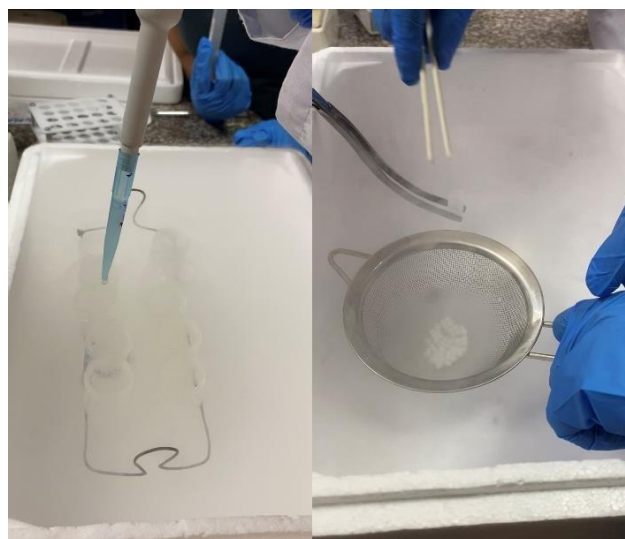
Anexo A. Elaboración de diluyentes y medios de congelación y vitrificación



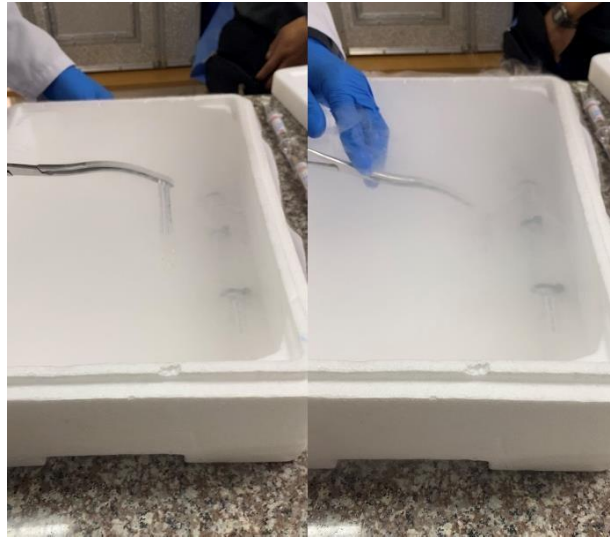
Anexo B. Reclección de semen mediante vagina artificial



Anexo C. Colocación de pajuelas de 0,5ml en rampas de congelación convencional en NL₂.



Anexo D. Proceso de vitrificación en pellets de 30 μ l a 15cm de distancia del NL₂.



Anexo E. Proceso de vitrificación en pajuelas de 0,25ml dentro de pajuelas de 0,5ml directamente a NL₂.



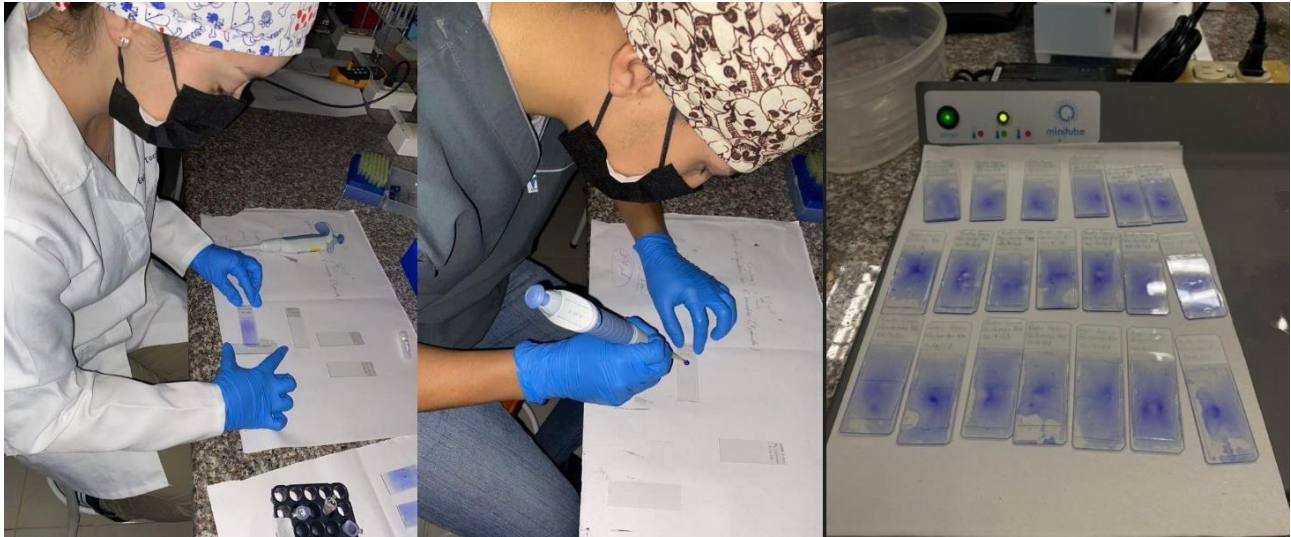
Anexo F. Proceso de calentamiento de muestras vitrificadas en pellets mediante dispositivo de calentamiento STC-3008 (de fabricación artesanal).



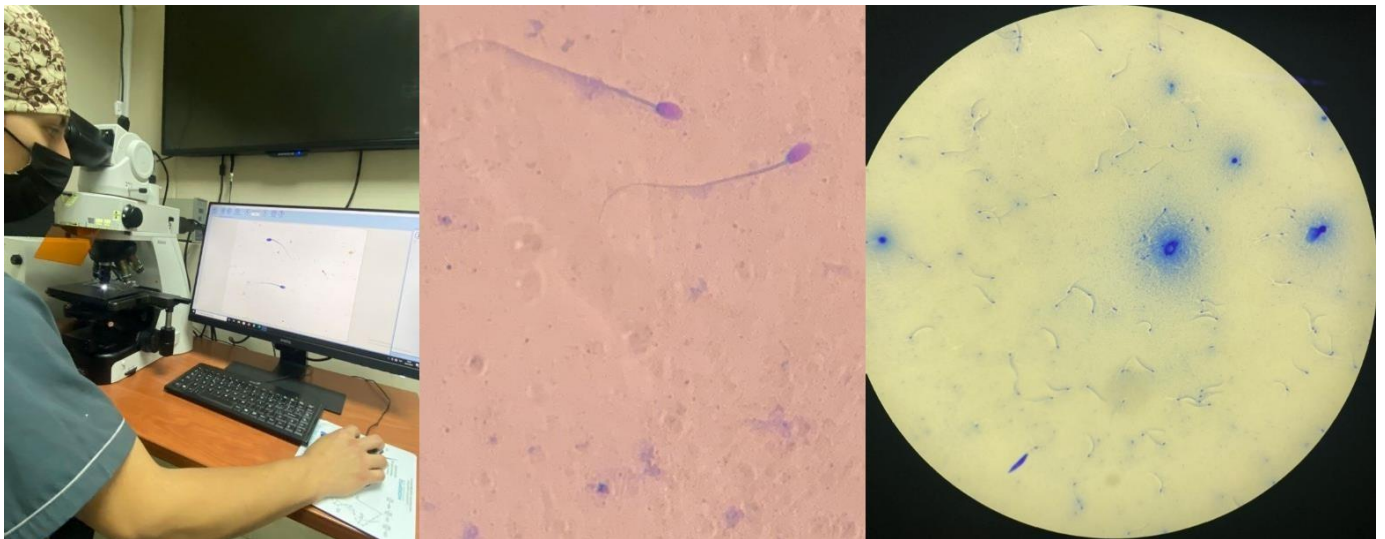
Anexo G. Proceso de calentamiento de muestras vitrificadas en pajuelas mediante baño María



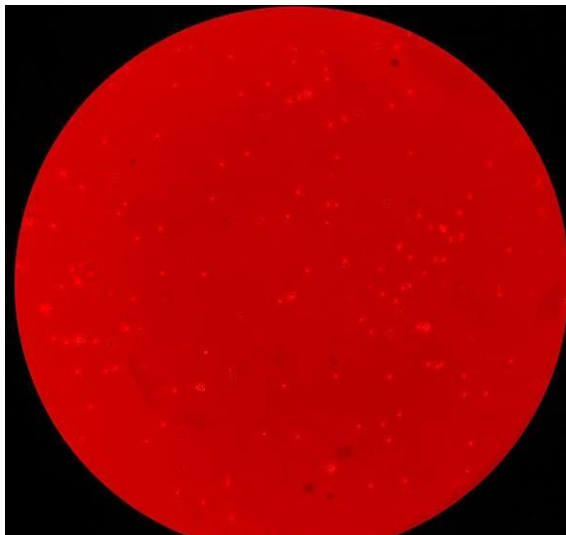
Anexo H. Evaluación de la cinética mediante el sistema CASA



Anexo I. Elaboración de frotis utilizando la tinción SpermBlue para análisis de morfometría espermática



Anexo J. Análisis de parámetros morfométricos de los espermatozoides



Anexo H. Análisis de integridad de membranas de los espermatozoides