

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la L-*carnitina* sobre la criosupervivencia y capacidad
fecundante de espermatozoides epididimarios caninos congelados y
vitrificados

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

Autores:

Jessica Paola Fernández Collahuazo

CI: 0104552575

Correo electrónico: pao.fernandez9621@gmail.com

Angel Eduardo Ramón López

CI: 0107177354

Correo electrónico: aeramonlopez@hotmail.com

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero PhD., Mgs., MVZ

CI: 0103912846

Cuenca, Ecuador

13-septiembre-2022

Resumen:

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la *L-carnitina* adicionada a diluyentes de congelación y vitrificación, sobre la criosupervivencia y capacidad fecundante en esperma epididimario de perro. Para esto, se recuperó el esperma de 60 epidídimos provenientes de 30 perros adultos orquiectomizados mediante flujo retrógrado. Posteriormente se conformaron veinte agrupaciones o pools de esperma (3 muestras epididimarias/pool). Cada pool se dividió en 2 alícuotas, una para congelación y otra para vitrificación. Para la congelación, se usó el diluyente TCG-EY (Tris, ácido cítrico, glucosa, 20% yema de huevo) y 5% de glicerol y se suplementó con 5mM (T1) y 0mM (T2, control 1) de *L-carnitina*; y para la vitrificación se usó el diluyente TCG-EY y 250 mM de sacarosa y se suplementó con 5 mM (T3) y 0 mM (T4, control 2) de *L-carnitina*. La cinemática, integridad de las membranas y capacidad fecundante fue evaluada de las muestras espermáticas de los tratamientos T1, T2, T3 y T4, mediante un sistema computarizado CASA (SCA®-2018), doble tinción fluorescente PI-PNA-FITC y FIV heteróloga (ovocitos bovinos), respectivamente. Después de la criopreservación, los resultados demostraron que el método de congelación produjo valores más altos ($P < 0,05$) de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL), y frecuencia de batida de flagelo (BCF) que el método de vitrificación, independientemente de la adición de *L-carnitina*. La *L-carnitina* no mejoró ($P > 0,05$) ningún parámetro cinemático de espermatozoides congelados o vitrificados. Sin embargo, *L-carnitina*, evidenció un efecto crioprotector debido a un incremento ($P < 0,05$) del porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto después del proceso de congelación y vitrificación. En la evaluación de la capacidad fecundante, se evidenció que las muestras congeladas con *L-carnitina* obtuvieron una mayor proporción pronúcleos formados comparados con muestras vitrificadas sin *L-carnitina* ($P < 0,05$). En conclusión, la adición de *L-carnitina* a los diluyentes de congelación y vitrificación, demostró un efecto benéfico crioprotector del plasmalema y acrosoma, incluso de la capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios de perro.

Palabras claves: Espermatozoides caninos. Epidídimo. Criopreservación. Congelación. Vitrificación. *L-carnitina*.

Abstract:

This work aimed to evaluate the effect of L-carnitine added to freezing and vitrification mediums on cryosurvival and fertilizing ability of dog epididymal spermatozoa. For this purpose, sperm was recovered from 60 epididymides from 30 ovariectomized adult dogs by retrograde flushing. Subsequently, twenty pool sperm samples were formed (3 epididymal samples/pool). Each pool was divided into two aliquots: one for freezing, and another for vitrification. For the freezing process, the TCG-EY extender (Tris, citric acid, glucose, 20% egg yolk) with 5% glycerol and supplemented with 5mM (T1) and 0mM (T2, control 1) L-carnitine were used. For the vitrification process, the TCG-EY extender plus 250 mM sucrose and supplemented with 5 mM (T3) and 0 mM (T4, control 2) of L-carnitine were utilized. The kinematics, membrane integrities, and fertilizing ability of all sperm samples (T1 - T4) were assessed using a CASA system (SCA®-2018), PI-PNA-FITC double fluorescence test, and heterologous in vitro fertilization (IVF) with zona-intact bovine oocytes, respectively. After cryopreservation, the results showed that the freezing method yielded greater values ($P < 0.05$) of progressive motility (PM), curvilinear (VCL) and rectilinear (VSL) velocities, and beat-cross frequency (BCF) than the vitrification method, irrespective of L-carnitine addition. L-carnitine did not improve ($P > 0.05$) any kinematic variables of frozen or vitrified sperm. However, L-carnitine showed a cryoprotective effect due to an improvement ($P < 0.05$) in the proportion of sperm with intact plasma membrane/intact acrosome after the freezing and vitrification process. Concerning fertilizing ability, it was evidenced that the samples frozen with L-carnitine obtained a higher proportion of pronuclei formed compared to vitrified samples without L-carnitine. In conclusion, the addition of L-carnitine to the freezing and vitrification mediums has a positive cryoprotective effect on the plasmalemma and acrosome membrane, even fertilizing ability of dog epididymal spermatozoa.

Keywords: Canine spermatozoa. epididymis. Cryopreservation. Freezing. Vitrification. L-carnitine.

Índice

OBJETIVOS	21
a. Objetivo general	21
b. Objetivos específicos	21
1. REVISIÓN DE LITERATURA	22
1.1. Características del semen de perro	22
1.1.1. Características macroscópicas	22
1.1.1.1. Volumen	22
1.1.1.2. Color	22
1.1.1.3. pH	22
1.1.2. Características microscópicas	23
1.1.2.1. Motilidad	23
1.1.2.2. Evaluación subjetiva	23
1.1.2.3. Evaluación objetiva	24
1.1.2.3.1. Terminología del sistema CASA:	24
1.1.2.4. Concentración	25
1.1.2.5. Morfología	26
1.1.2.6. Integridad de membranas	26
1.1.2.7. Integridad del acrosoma	27
1.1.2.8. Integridad de la membrana plasmática	27
1.2. Recuperación de semen post-mortem	28
1.2.1. Flujo retrógrado	28
1.2.2. Slides-Swim out	29
1.3. Criopreservación del semen canino	29
1.4. Mecanismos de criolesión en semen canino	30
1.4.1. Estrés oxidativo	30
1.4.2. Estrés osmótico	32
1.4.3. Estrés térmico	32
1.5. Antioxidantes usados en la criopreservación de semen canino	33
1.5.1. L- carnitina	34

1.5.1.1. Estructura y función metabólica.....	34
1.6. Capacidad fecundante en la fecundación <i>in vitro</i>	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Materiales.....	37
Materiales Físicos	37
Materiales Biológicos	37
Reactivos	37
Materiales de Laboratorio	39
2.2. Métodos	40
2.2.1. El área de estudio	40
2.2.2. Unidad experimental y diseño experimental	40
2.2.3. Elaboración de diluyentes y medios	41
2.2.4. Metodología para la Investigación	44
2.2.4.1. Recuperación espermática y agrupaciones (pools)	45
2.2.4.2. Suplementación de L-carnitina a diluyentes y tratamientos .	46
2.2.4.3. Criopreservación de espermatozoides	46
2.2.4.3.1. Congelación convencional (CC)	47
2.2.4.3.2. Vitricación (Vt).....	47
2.2.4.4. Análisis de calidad espermática	48
2.2.4.4.1. Parámetros cinéticos	48
2.2.4.4.2. Estado de membranas espermáticas	49
2.2.4.5. Evaluación de la capacidad fecundante.....	49
2.3. Análisis estadístico	51
3. RESULTADOS	53
3.1. Parámetros cinéticos	53
3.2. Estado de membranas espermáticas	55
3.3. Capacidad fecundante	56
4. DISCUSIÓN	60
7. REFERENCIAS	67

Índice de figuras

Figura 1. Diseño experimental.....	41
Figura 2. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin L-carnitina..	53
Figura 3. Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin L-carnitina.....	54
Figura 4. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin L-carnitina.....	55
Figura 5. Estatus de membranas espermáticas de muestras congeladas y vitrificadas con o sin L-carnitina. IPIA, membrana plasmática íntegra y acrosoma íntegro; IMP, integridad total de membrana plasmática; e IMA, integridad de membrana acrosomal.....	56
Figura 6. Poliespermia y formación de pronúcleos.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Terminología del sistema CASA	24
Tabla 2. Diluyente base TCG.....	42
Tabla 3. Diluyentes para congelación convencional (CC).....	42
Tabla 4. Diluyentes para Vitricación.....	42
Tabla 5. HEPES para fluorescencia.....	43
Tabla 6. Yoduro de propidio.....	43
Tabla 7. Aglutinina	43
Tabla 8. Gradientes de densidad de BoviPure.....	43
Tabla 9. Medio MIV	44
Tabla 10. Medio FIV.....	44
Tabla 11. Correlación entre variables cinemáticas y el porcentaje de formación pronuclear de los cuatro tratamientos en estudio.....	58
Tabla 12. Interacción espermatozoide-ovocito y formación de pronúcleos en cada uno de los tratamientos y, en la FIV homóloga.	59

Índice de Anexos

Anexo 1. Orquiectomía en un perro mayor a un año de edad.	81
Anexo 2. Método de conservación de muestras con bolsas ziploc en un cooler previo al procesamiento.	8681
Anexo 3. Separación del epidídimo para facilitar la extracción de semen, a partir de estos.	872
Anexo 4. Canalización del conducto deferente para llevar a cabo el proceso del flujo retrógrado, para recuperación de semen.	872
Anexo 5. Conformación de los pools a partir de 3 muestras epididimarias óptimas.	883
Anexo 6. Esterilización de pajuelas previo a la congelación de semen.	883
Anexo 7. Conformación de los pellets, con gotas de las muestras espermáticas (30 µl) a 15 cm de altura.	894
Anexo 8. Semen descongelado atemperándose en baño María previo al análisis de motilidad.	894
Anexo 9. Adición de la mezcla de fluorescencia en la muestra espermática con hepes y con la luz apagada.	905
Anexo 10. Evaluación de las muestras teñidas, para definir la integridad de membranas espermáticas.	905
Anexo 11. Limpieza de campos de motilidad del sistema CASA.	916
Anexo 12. Aspiración folicular de ovarios del camal de Cuenca.	916
Anexo 13. Búsqueda y clasificación de ovocitos para colocarlos a madurar (MIV).	927
Anexo 14. Placas una vez realizadas el proceso de fijación, tinción y montaje para evaluar el resultado de la FIV a las 24 h.	927

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Jessica Paola Fernández Collahuazo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Efecto de la L-carnitina sobre la criosupervivencia y capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios caninos congelados y vitrificados”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de septiembre del 2022



Jessica Paola Fernández Collahuazo

C.I: 0104552575

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Angel Eduardo Ramón López en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Efecto de la L-carnitina sobre la criosupervivencia y capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios caninos congelados y vitrificados”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de septiembre del 2022



Angel Eduardo Ramón López

C.I: 0107177354

Cláusula de Propiedad Intelectual

Jessica Paola Fernández Collahuazo, autora del trabajo de titulación “Efecto de la L-carnitina sobre la criosupervivencia y capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios caninos congelados y vitrificados”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de septiembre del 2022



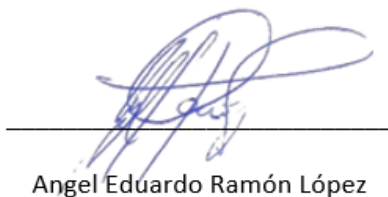
Jessica Paola Fernández Collahuazo

C.I: 0104552575

Cláusula de Propiedad Intelectual

Angel Eduardo Ramón López, autor del trabajo de titulación “Efecto de la L-carnitina sobre la criosupervivencia y capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios caninos congelados y vitrificados”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 13 de septiembre del 2022



Angel Eduardo Ramón López

C.I: 0107177354

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, por guiarnos en cada paso hacia la culminación de la carrera universitaria. A nuestros familiares y amigos, que nos apoyaron y aconsejaron tanto en lo personal como académico, para desarrollarnos de la mejor manera en el ámbito universitario.

Al Dr. Diego Galarza, por haber dirigido nuestra tesis, apoyarnos, corregirnos y darnos alternativas para el mejor desarrollo de este trabajo. Así también al Dr. Xavier Samaniego, que con mucha paciencia nos supo dirigir como técnico docente durante el proceso de la parte experimental de la tesis. Además, un agradecimiento especial al Dr. Fernando Perea, Dr. Elías Segarra y al Dr. Mauricio Dumas, por el apoyo brindado dentro del laboratorio de biotecnología.

Finalmente extendemos nuestro agradecimiento a todos los docentes de la carrera de medicina veterinaria, que por los conocimientos brindados a lo largo de la carrera hicieron posible el entendimiento y mejor desarrollo de esta tesis.

Angel & Paola

DECICATORIA

Dedico esta tesis de graduación a los pilares fundamentales a lo largo de toda mi vida que son mis padres, en especial a mi madre quien ha sido una mujer fuerte, nunca se dejó vencer de las adversidades que se pusieron en nuestro camino, supo sacarnos adelante y nos regaló lo más grande que es ser profesionales.

A mi querido abuelito Virgilio que gracias a su apoyo hemos podido avanzar en nuestras carreras profesionales y quien siempre ha estado para nosotras desde niñas.

A mis hermanas Cristina y Katy quienes han sido mi gran compañía y ayuda a lo largo de mis estudios.

A mi familia, amigos y esas personas que han sido importantes y han llegado con las palabras correctas en momentos necesarios.

Jessica Paola Fernández Collahuazo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis primeramente a mis padres, quienes han sido un apoyo en todo sentido desde el primer día que inicié esta grandiosa y noble carrera, así también a mis hermanos que supieron aconsejarme y animarme cuando lo necesité.

Dedico también a los docentes y profesionales que me enseñaron lo que es el día a día de esta profesión y me dieron la oportunidad de ganar experiencia.

Finalmente, dedico esta tesis a todos los animales tanto de la granja como la clínica de la facultad, con los que pude aprender y perfeccionarme a lo largo de la carrera, que, en cierto sentido, me enseñaron lo que es ejercer la medicina sin necesidad de que me hablen.

Angel Ramón L.

ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

ATP: Adenosín trifosfato

BCF: Frecuencia de batida del flagelo

BSA: Albúmina sérica bovina

CU: Congelación ultrarrápida

CASA: Análisis espermático asistido por computadora

CC: Congelación convencional

Co: Control

COC: Complejo cúmulo-ovocito

DPDA: Membrana plasmática dañada, acrosoma dañado

DPIA: Membrana plasmática dañada, acrosoma intacto

FCS: Suero fetal bovino

FIV: Fertilización in vitro

Gly: Glicerol

Hz: Hertz

IA: Inseminación artificial

IMP: Integridad de membrana plasmática

IMA: Integridad de membrana acrosomal

IPDA: Membrana plasmática intacta, acrosoma dañado

IPIA: Membrana plasmática intacta, acrosoma intacto

LC: L-*carnitina*

LIN: Índice de linealidad

LPO: Peroxidación lipídica

MIV: Maduración in vitro

MP: Motilidad progresiva

MT: Motilidad total

NL₂: Nitrógeno líquido

PI: Yoduro de propídio

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

ROS: Especies reactivas de oxígeno

STR: Índice de rectitud

TCG: Tris, tes y glucosa

VAP: Velocidad promedio del espermatozoide

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

Vt: Vitrificación

WOB: Índice de oscilación

YH: Yema de huevo

ZP: Zona pelúcida

INTRODUCCIÓN

El uso de semen criopreservado ha tenido una relevancia evidente en las últimas décadas, siendo una herramienta eficaz para conservar el material genético de varias especies de animales domésticos de alto valor zootécnico o de animales silvestres autóctonos o nativos en amenaza latente de extinción. Este método incluso ha trascendido cuando el espermatozoide se ha obtenido de animales que murieron inesperadamente y poseen una relevancia genética que deseamos conservar (Olivo et al., 2017; Yáñez et al., 2021).

En la especie canina la criopreservación de espermatozoides junto con la inseminación artificial (IA) son consideradas como las biotecnologías más importantes en el área de la reproducción asistida (Abdillah et al., 2019). Sin embargo, el proceso de criopreservación de espermatozoides de perro, sigue constituyendo una dificultad tecnológica debido a sus bajas tasas de criosupervivencia celular (Santiago-Moreno y Galarza, 2019) y, en consecuencia, bajas tasas de fertilidad obtenidas después de la IA (Uchoa et al., 2012) en comparación con el semen fresco. Varios intentos han sido desarrollados para incrementar la criosupervivencia espermática bajo condiciones experimentales *in vitro*, pero su respuesta ha sido poco deseable obteniendo resultados de motilidad y viabilidad de carácter variado (ej. entre el 15 al 35%) (Saacke et al., 2000).

La criosupervivencia espermática es afectada principalmente por el choque de frío, el estrés oxidativo y osmótico, la deshidratación celular (Hammerstedt et al., 1990; Mazur, 1984) y las velocidades de enfriamiento (Grötter et al., 2019) durante la criopreservación. La interacción de estos factores provoca daños irreversibles de la membrana plasmática y disminución de la capacidad fecundante (Watson, 1995). El estrés oxidativo está asociado con la peroxidación lipídica (LPO) de la membrana plasmática, que conduce a una reducción de la calidad espermática (Budai et al., 2014). La alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las membranas de los espermatozoides caninos los hace muy vulnerables al daño oxidativo (Farstad et al., 2009). Además, los espermatozoides de perro también son vulnerables al ataque de los radicales libres (ej. H_2O_2 , O_2^- y OH^-) ya que contienen elevadas concentraciones de PUFA. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se

combinan fácilmente con los PUFA de las membranas plasmáticas, y se desencadena una alta producción de LPO (Aitken y Baker, 2004; 2006). Se conoce que el aumento de ROS durante el enfriamiento y congelación altera las membranas mitocondriales y plasmáticas de los espermatozoides, lo que altera su motilidad (Amidi et al., 2016).

Durante la congelación convencional con vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático la velocidad de enfriamiento inicial es rápida (ej. 40°C/min) durante el rango crítico de temperatura (-5°C a -25°C) (Galarza et al., 2019a, 2019b). Esto provoca mayoritariamente que se formen cristales de hielo intracelular letal para los espermatozoides (Chenoweth y Lorton, 2014; Woods et al., 2004) debido a la incapacidad de deshidratarse eficientemente (Mazur, 1977; Grötter et al., 2019).

Los protocolos convencionales de congelación de espermatozoides caninos han mostrado resultados variables de criosupervivencia. Los protocolos de congelación convencionales más utilizados para la criopreservación de semen canino utilizan diluyente a base de TRIS + glicerol y pajuelas expuestas a vapores de NL₂ contenidos en cajas criogénicas de espuma de poliestireno (Álamo et al., 2005). Las concentraciones de glicerol en los diluyentes (ej. TRIS + yema de huevo o Pipes + yema de huevo) oscilan entre el 4 y el 11 % (v/v) (Martins-Bessa et al., 2006; Peña et al., 1998; Rota et al., 1998). La adición de 5 o 7% de glicerol (v/v) a las muestras de semen (enfriadas o a temperatura ambiente) diluidas en TCG-EY (Tris, ácido cítrico y glucosa + 20% (v/v) de yema de huevo) durante 1 h antes de la congelación parece ser útil para criopreservar espermatozoides de perro eyaculado (Kim et al., 2010; 2012). Tres horas es el tiempo de equilibrio estándar para congelar espermatozoides eyaculados de perro (Caturla-Sánchez et al., 2018). Los espermatozoides epididimarios generalmente requieren tiempos de equilibrio más cortos de exposición a crioprotectores que los espermatozoides eyaculados (Pradieé et al., 2018) y, por lo tanto, también se debe esperar una mejor respuesta que los tiempos de equilibrio más largos en los espermatozoides del epidídimo de perros como fue demostrado por Galarza et al. (2021).

Por ello, los investigadores se han enfocado en nuevas alternativas para criopreservar espermatozoides de perro usando vapores de NL_2 que permitan mejorar la respuesta a la criopreservación. En este sentido, Caturla-Sánchez et al. (2018) propusieron un sistema de congelamiento de espermatozoides en dos rampas dentro de una caja criogénica (*poliestireno*) y la exposición de las muestras a vapores de NL_2 durante 2 minutos antes de la inmersión. En este sentido, en una investigación precedente, Galarza et al. (2021) probaron este procedimiento de congelación en espermatozoides epididimarios de perros obteniendo resultados aceptables de motilidad y viabilidad espermática. Por lo tanto, la aplicación de esta técnica de corto tiempo de congelación resulta fácil al momento de congelar espermatozoides canino domésticos (o silvestres) y podría proporcionar resultados deseables para ser aplicado en técnicas de reproducción asistida (TRA).

La congelación ultrarrápida (CU) y/o vitrificación (V), es otra alternativa de criopreservación de semen, en esta se emplean velocidades de enfriamiento muy rápidas en donde el uso de concentraciones elevadas de crioprotectores no penetrantes (ej. sacarosa o trehalosa) y un enfriamiento rápido permite que las soluciones se enfríen a temperaturas extremadamente bajas sin que se forme hielo en absoluto (Holt et al., 2014). En consecuencia, la vitrificación no forma cristales de hielo y alcanza la transición vítrea más rápido y estable (Restrepo et al., 2009). La vitrificación, se ha realizado en espermatozoides de diferentes especies, pero aún no se han establecido resultados exitosos (Kumar et al., 2019). En espermatozoides caninos se han obtenido resultados poco deseables de motilidad espermática, pero una buena viabilidad, (Caturla-Sánchez et al. 2018; Galarza et al., 2021). Aunque otro estudio también ha reportado resultados deseables tanto de viabilidad y motilidad (Zakošek et al. 2020).

Debido a que los resultados en los protocolos de criopreservación han sido poco deseables en cuanto a la criosupervivencia de espermatozoides de diferentes especies de animales, el uso de aditivos – antioxidantes han sido agregados a los medios de criopreservación. Estos compuestos antioxidantes pueden proporcionar a los espermatozoides la capacidad de neutralizar y eliminar los compuestos oxidativos (ej. ROS y radicales libres), producidas durante el proceso de

congelación y descongelación y consecuentemente, mitigar los efectos de la LPO de la membrana plasmática (Martínez et al., 2020). Estos antioxidantes son sustancias capaces de retardar y/o prevenir la oxidación de cualquier sustrato oxidante como proteínas, lípidos y ADN, que son compuestos que forman parte de la estructura del espermatozoide (Halliwell y Gutteridge, 2015).

La L- *carnitina* (LC) es un aminoácido no esencial, sintetizado a partir de los aminoácidos esenciales lisina y metionina que juega un papel importante en el transporte de ácidos grasos de cadena corta, media y larga a la mitocondria para la β -oxidación, que provoca un aumento de producción de ATP (Jeulin et al., 1987; Lenzi et al., 1992). La LC ha demostrado ser eficaz sobre distintas variables espermáticas de algunas especies de animales como los gatos (Manee-in et al., 2014), carneros (Galarza et al., 2020), búfalos (Badr et al., 2017), gallos (Fattah et al., 2017) e incluso en los humanos (Lenzi et al., 2004). No obstante, en el caso de perros, la LC se ha suplementado únicamente en la dieta, mejorando los niveles de la hormona testosterona, el volumen del semen, el pH y la tasa de concepción (El-mamlouk et al., 2020), por lo tanto, hasta donde conocemos, no existe evidencia científica sobre la suplementación de LC en medios de congelación y vitrificación de espermatozoide epididimario.

La fecundación *in vitro* (FIV), aparte de los parámetros cinemáticos básicos (ej. motilidad progresiva, velocidad curvilínea y rectilínea), es un indicador competente que brinda información sobre la interacción de los gametos, la penetración de los espermatozoides, la formación pronuclear y el desarrollo temprano del embrión (Brahmkshtri et al., 1999). La capacidad fecundante del espermatozoide de canino criopreservado ha sido evaluada con éxito mediante FIV homóloga utilizando ovocitos de perra (Holst et al., 2000; Mastromonaco et al., 2002; De los reyes et al., 2006; Silva et al., 2006). La FIV heteróloga usando ovocitos de vaca madurados *in vitro* y espermatozoides criopreservados de diferentes especies domésticas (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000; Vasconcelos et al., 2016; Galarza et al., 2019) y silvestres (Thuwanut et al., 2011; Pradiee et al., 2018; Gañán et al., 2009) ha constituido una TRA relevante para evaluar la capacidad fecundante. Sin embargo, no se ha reportado FIV heteróloga usando espermatozoides epididimarios

caninos congelados o vitrificados. Por lo tanto, la FIV heteróloga usando espermatozoides criopreservados y ovocitos de vaca madurados *in vitro*, sería una TRA importante para evaluar la capacidad fecundante de esos gametos. Además, la accesibilidad a ovocitos (homólogos) de perra que sean adecuados para la FIV es muy limitada. Por lo tanto, el uso de la FIV heteróloga evita esta limitación.

Al respecto, en esta investigación se planteó la hipótesis de que al suplementar LC al diluyente TCG-EY y que acortar el tiempo de equilibrio antes del método de congelación convencional o usar la vitrificación podría producir resultados deseables de criosupervivencia de espermatozoides epididimarios de perro. Por consiguiente, este experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de la L-*carnitina* y la eficacia de dos protocolos de criopreservación de espermatozoides epididimarios de perro recuperados de testículos almacenados en frío durante 96 h, uno mediante congelación convencional con tiempos de equilibrio y enfriamiento más cortos, y el otro mediante vitrificación sobre la criosupervivencia celular y capacidad fecundante.

OBJETIVOS

a. Objetivo general

Evaluar el efecto de la L-*carnitina* suplementado a diluyentes de congelación y vitrificación sobre la criosupervivencia celular y capacidad fecundante de espermatozoides caninos epididimarios.

b. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta a la criopreservación (congelación-descongelación y vitrificación-calentamiento) de espermatozoides caninos sobre los parámetros cinéticos de motilidad e integridad de las membranas espermáticas
- Evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides caninos congelado-descongelados y vitrificados-calentados mediante una fecundación *in vitro* heteróloga
- Correlacionar los parámetros cinéticos de progresión y la fertilidad lograda *in vitro*.

HIPÓTESIS

La adición de L-*carnitina* a los medios de congelación y vitrificación a base de TCG (Tris, ácido cítrico y glucosa + 20% yema de huevo [v/v]), permite mejorar la criosupervivencia celular basada en un incremento de la cinética espermática, integridad de las membranas espermáticas y la capacidad fecundante bajo condiciones *in vitro*.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Características del semen de perro

El análisis del material seminal es un aspecto importante a la hora de considerar la calidad espermática en cuanto a fertilidad y es necesario realizarlo antes de la inseminación artificial o criopreservación. Las características que se relacionan de manera íntima con la fertilidad son: número de espermatozoides por volumen de semen, porcentaje de movilidad progresiva y morfología espermática (Andrade, 2005).

1.1.1. Características macroscópicas

1.1.1.1. Volumen

La cantidad varía de acuerdo al tamaño del animal, en general, el semen proveniente de la cola del epidídimo es de 1 a 3 ml (Páramo y Balcázar, 2005).

1.1.1.2. Color

Generalmente el semen del perro es de color blanco a opalescente, pero esto depende de la concentración espermática, considerándose así a un semen claro e incoloro de mala calidad (Feldman y Nelson, 2004). El semen colectado de la cola del epidídimo es de color blanco-lechoso, este color además sirve como indicativo cuando se colecta el semen mediante manipulación manual siendo el de mayor calidad la segunda porción del eyaculado (rico en espermatozoides) (Páramo y Balcázar, 2005).

1.1.1.3. pH

El semen normal va de 6,5 a 7 (Pontón y Lagos, 2014).

1.1.2. Características microscópicas

1.1.2.1. Motilidad

La motilidad espermática se considera el criterio más importante a la hora de evaluar la fertilidad del macho, esta tiene gran influencia en el proceso de interacción de los gametos, una disminución en la velocidad y en la proporción de espermatozoides con movimiento progresivo indica que existen afecciones celulares, reduciendo así las posibilidades de fecundación (Kjaestad et al., 1993).

1.1.2.2. Evaluación subjetiva

Es el método más frecuentemente realizado para estimar la calidad espermática (Budworth et al., 1998), pero al ser subjetiva, existe variación de los criterios de acuerdo a los técnicos que la evalúan, así que el entrenamiento y la experiencia del técnico son aspectos que se consideran importantes (Linford et al., 1976).

La evaluación se realiza colocando una gota de semen sobre un portaobjetos y se cubre. En la observación al microscopio se aprecia movimientos de masas de espermatozoides en forma de ondas, la existencia de estas ondas se considera generalmente como indicio de buena vitalidad y alta concentración de los espermatozoides (Salinas et al., 2013); en una escala de 0 a 5, se considerará un semen apto cuando hayan alcanzado un score de 3 o más. Al realizar una magnificación de 1000 aumentos se puede evaluar la motilidad individual, esto se realiza observando varios campos y considerando el número de espermatozoides móviles (excepto las células que tienen movimientos ondulatorios). Para que un animal sea considerado fértil o que el semen sea considerado de calidad, debe tener un porcentaje mayor al 70%, valores menores a este se le clasifica como subfertil (Pontón y Lagos, 2014).

1.1.2.3. Evaluación objetiva

La determinación objetiva de una muestra de semen no siempre se puede realizar de manera visual, pero actualmente varios autores están utilizando el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) obteniendo valores precisos en cuanto a motilidad espermática y, además, la calidad de movimiento que proyectan los espermatozoides (Álamo, 2007), posibilitando así un análisis automático, rápido y objetivo. Esta técnica se puede usar tanto en semen fresco como en el congelado, refrigerado o capacitado (Martínez, 2004). Presenta ciertos inconvenientes como la necesidad de diluir el semen hasta obtener una concentración de $50 - 100 \times 10^6$ esp/mL y, además, la confusión del sistema entre espermatozoides y partículas de la yema de huevo que se encuentra en los diluyentes (Rijsselaere et al., 2003).

A pesar de la naturaleza automática y la objetividad de los resultados, al igual que los métodos cualitativos, están limitados por diversos factores tanto biológicos como técnicos (análisis estadístico, ritmo de captura, estabilidad matemática de la medición, condiciones de medición, tamaño de la muestra, etc.) (Davis y Siemers, 1995). CASA emplea el uso de una computadora, una cámara de video y un software para el respectivo análisis, este sistema rastrea múltiples imágenes del movimiento celular (60 fotogramas por segundo con 40 fotogramas observados) para proporcionar datos al sistema, lo que arroja finalmente una ruta o trayectoria lineal individual de los espermatozoides (Dascanio, 2014).

1.1.2.3.1. Terminología del sistema CASA:

El software provee una serie de medidas de la motilidad de los espermatozoides. Los dos parámetros que se reportan de manera más común son la motilidad total y progresiva (Dascanio, 2014). Otros parámetros se describen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Terminología del sistema CASA

Abreviatura	Definición	Descripción
MOT	Espermatozoides motiles (%)	Porcentaje de espermatozoides con motilidad.
PM	Espermatozoides motiles progresivos (%)	Porcentaje de espermatozoides con STR >80%
VCL	Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	Velocidad de recorrido de los espermatozoides desde el punto actual hasta el punto real siguiente.
VAP	Velocidad promedio ($\mu\text{m/s}$)	Velocidad promedio del espermatozoide.
VSL	Velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$)	Velocidad medida en línea recta, desde el punto de inicio hasta el punto final.
STR	Índice de rectitud (VSL/VAP, %)	Proximidad del recorrido del espermatozoide a una línea recta.
LIN	Índice de linearidad (VSL/VCL, %)	Proximidad de la trayectoria real del espermatozoide a una línea recta.
BCF	Frecuencia de cruces (Hz)	Promedio de la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio.
ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ($\mu\text{m/s}$)	Magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria.

(Adaptado de www.micropticsl.com)

1.1.2.4. Concentración

El valor de este puede obtenerse a partir de la muestra mediante distintos métodos, entre estos se destacan la espectrofotometría, citometría de flujo y el uso de las cámaras de Bürker, Neubauer o Thoma (Mellisho, 2010). En el semen de perro la concentración espermática se mide frecuentemente con la cámara de Neubauer (England y Allen, 1989), en donde previamente se realiza una dilución de la muestra

de semen con solución salina formolada y se observa y se realiza el conteo en un microscopio óptico de 40x (Threlfall, 2005). En los perros se ha demostrado un rango bastante amplio en el número de espermatozoide, esto se le atribuye al margen de amplitud en relación a las dimensiones de los testículos (Vaca Granda, 2016). Se han descrito valores de concentración seminal que oscilan entre 300-2000 millones de espermatozoides por mililitro (Concannon., 1993), y se considera que para que una inseminación artificial sea exitosa o para que una perra se preñe se necesitan 250×10^6 esp/mL (Vaca Granda, 2016).

1.1.2.5. Morfología

En los perros, la morfología espermática no está relacionada con la fertilidad (a diferencia de otras especies), pero si está asociada con la mala motilidad (Vaca Granda, 2016). Este parámetro suele ser evaluado con un microscopio óptico convencional o uno de contraste de fases con o sin tinción (Kustritz et al., 1998). Una de las técnicas de tinción más comúnmente usadas es la eosina- nigrosina, la cual consiste en colocar una gota de semen en el extremo del portaobjetos junto con una gota de eosina-nigrosina y con otro portaobjetos esparcir la mezcla mediante un frotis (Vaca Granda, 2016). Los animales destinados a la reproducción deben presentar al menos un 70% de espermatozoides morfológicamente normales en la evaluación o tener menos de un 20% de espermatozoides anormales (Rijsselaere et al., 2005).

Las anomalías morfológicas se clasifican en primarias y en secundarias, en cuanto a las primarias, estas son aquellas que surgen debido a una alteración de la espermatogénesis (malformaciones de cabeza, pieza intermedia y del flagelo), mientras que las morfoanomalías secundarias son debidas a un problema en la espermiogénesis o por un incorrecto manejo del semen por parte del experimentador o técnico (persistencia de gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma) (Martínez, 2004).

1.1.2.6. Integridad de membranas

Una vez extraído el semen, durante el proceso de dilución, refrigeración y congelación, existe afectación de la membrana plasmática de la cabeza del

espermatozoide, membrana mitocondrial, membrana acrosomal y, además, el flagelo, lo que sin duda afecta la capacidad fecundante del espermatozoide (Hammerstedt et al., 1990).

1.1.2.7. Integridad del acrosoma

La evaluación del estado acrosomal en el esperma canino se describe como un método confiable a la hora de predecir la fertilidad del semen post-descongelación (Concannon, 1989), o para evaluar la calidad del semen antes de realizar un proceso de criopreservación (Ivanova et al., 1999).

La evaluación de la integridad del acrosoma se logra usando distintas técnicas de tinción, entre estas se encuentran el método Giemsa, eosina/nigrosina/Giemsa, Hoescht, lecitinas como *Pisum sativum* (PSA) junto con fluoresceína FITC (recomendado por la facilidad de preparación y de interpretación, gracias a la fuerte coloración que generan) (Smith y Murray, 1997).

1.1.2.8. Integridad de la membrana plasmática

La membrana plasmática íntegra es fundamental para que el espermatozoide tenga la capacidad de fertilizar el ovocito (Rijsselaere et al., 2005), y además se lo considera como un requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil (De Leeuw et al., 1991). Un espermatozoide con la membrana plasmática deteriorada no puede mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y co-factores esenciales para el movimiento flagelar, entre ellos la adenina (De Leeuw et al., 1991).

La integridad de los espermatozoides de perro es evaluada mediante colorantes vitales, los cuales ayudan a distinguir los espermatozoides vivos de los muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir que estos colorantes ingresen o no a la célula (Rijsselaere et al., 2005). Para determinar la cantidad de vivos o muertos se necesitan combinaciones de colorantes como eosina/nigrosina, Hoescht, caboxifluoresceína/yoduro de propídio y SYBR-14/yoduro de propídio (Smith y Murray, 1997).

1.2. Recuperación de semen post-mortem

La recuperación de gamoplasma canino macho recientemente muerto (post-mortem) o por orquiectomía principalmente, se da por medio de la colecta en el epidídimo testicular (Benítez et al., 2018). En caninos la obtención y conservación post-mortem o post-orquiectomía de espermatozoides viables de cola de epidídimo, se ha considerado como una técnica de gran importancia para la preservación de animales con alto valor genético (Armas et al., 2011). Para ello se han venido utilizando varias técnicas, entre algunas podemos mencionar a: flujo retrógrado y slicing-swim out.

Previo a ejecutar cualquier método o técnica, a cada testículo se realiza un lavado externo con solución salina fisiológica (NaCl) al 0.9% con el objetivo de remover sangre y contaminantes externos (Sánchez y Sánchez, 2015).

1.2.1. Flujo retrógrado

En grandes rasgos este método consiste en promover un flujo retrógrado en la cola del epidídimo aplicando presión sobre los conductos deferentes hasta que el contenido de la cola salga a través de un corte realizado en la unión con el cuerpo del epidídimo (Garde et al, 1994). La presión se genera con una jeringa, que inyecta aire o algún diluyente que no sea espermicida (Lambrechts et al, 1999).

Esta técnica inicia diseccionando los testículos, con ello retirando todas las tunicas para poder así canular el conducto deferente (Sánchez y Sánchez, 2015).

Una vez localizados la cola del epidídimo y el conducto deferente de los testículos, se coloca en un tubo cónico graduado, dejando el conducto deferente fuera del tubo (Ávalos et al., 2018; González et al, 2013). Con una aguja se facilita la introducción en la luz del conducto deferente; que está conectado a una jeringa de tuberculina que contiene 1 ml de dilutor. Por presión del embolo de la jeringa se rellena con el dilutor en todo el conducto del epidídimo. Una vez que el epidídimo está repleto de dilutor se realiza un corte en la parte del inicio de la cola del epidídimo donde el fluido emerge por flujo retrogrado y finalmente se recepta en un tubo de ensayo de 5 ml (Condemayta, 2017).

Esta técnica es la más indicada, debido a que las muestras obtenidas tienen menor nivel de contaminación y son de mejor calidad en relación a otros métodos (Mota y Machado, 2012). Aunque esta técnica tiene la limitación de ser más compleja que las otras (Martinez-Pastor et al., 2006).

1.2.2. Slides-Swim out

Esta técnica de recolección consiste en que una vez que se ha recolectado tanto el epidídimo con los vasos deferentes se deshecha el exceso de grasa y tejido localizado, se coloca en una caja de Petri con lactato de Ringer a 37°C, con el objetivo de lavar los residuos. Con una tijera quirúrgica se realizan varios cortes (picado en trozos) en la cola del epidídimo dentro de una caja de Petri, en donde se coloca un crioprotector a 37°C. Los espermatozoides son recuperados succionando el contenido con una jeringa de 20 ml, luego son depurados y colocados en un tubo falcon, para luego ser centrifugado, en donde el sobrenadante es descartado. (Sztein, 2013; Harshan et al., 2006; Benitez et al., 2018)

1.3. Criopreservación del semen canino

La criopreservación de semen tiene ciertos beneficios, entre estos se destaca la posibilidad de salvaguardar las características génicas que tienen como fin la mejora de las especies, así como también la conservación de especies o razas en peligro de extinción (Andrade, 2005). A pesar de que esta biotecnología representa beneficios, es importante considerar que los distintos procedimientos de criopreservación afecta la calidad espermática, induciendo cambios estructurales y moleculares en estos, debido al daño térmico, osmótico, mecánico y oxidativo (Qamar et al., 2020).

La refrigeración del semen, es uno de los métodos de criopreservación a corto plazo (pero es parte del proceso de congelación) (Andrade, 2005). Para este proceso se tiene que añadir al medio de dilución un compuesto que evite la muerte espermática por un choque de frío, tal como la yema de huevo en donde se han obtenido grandes resultados (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001). El objetivo de refrigerar el semen es aumentar la vida útil de los espermatozoides, disminuir el metabolismo basal y salvaguardar los parámetros de calidad y fertilidad durante cortos períodos de

tiempo (Luño et al., 2020). Estudios realizados en la especie canina, han demostrado que al usar un diluyente que tiene como base la yema de huevo, mantiene la viabilidad espermática hasta por 10 días a 4 °C (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001).

A diferencia del semen refrigerado, durante el proceso de congelación se necesita, además, el uso de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura (Andrade, 2005), la función de estos crioprotectores es evitar la formación de hielo intracelular y el daño en la membrana celular (Betancur et al., 2009). Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intracelular forma micro-cristales y los daños por estos son muy reducidos (Amann y Pickett, 1987). En general, los pasos del proceso, que incluyen dilución, refrigeración, congelación y descongelación, disminuyendo así la capacidad de fertilización (De Lima et al., 2019), esto debido a las criolesiones provocadas por el choque térmico, la formación de hielo, la deshidratación, la concentración de sal y el choque osmótico (Galarza et al., 2019).

1.4. Mecanismos de criolesión en semen canino

Cuando se realizan técnicas de criopreservación de semen los espermatozoides experimentan estrés en forma de choque frío, estrés osmótico y principalmente estrés oxidativo durante la congelación y descongelación (Kumar et al., 2019), lo que afecta la tasa motilidad espermática, la tasa de integridad acrosomal (Dawar et al., 2018) y como consecuencia reduce la viabilidad y la fertilidad del espermatozoide (Kumar et al., 2019).

1.4.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre los niveles de especies reactivas de oxígeno y antioxidantes (Vieira et al., 2018), es decir, el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de los sistemas biológicos para desintoxicar fácilmente los reactivos intermedios o reparar fácilmente el daño (Bansal y Bilaspuri, 2010). Es uno de los factores más importantes que contribuyen a la mala calidad del semen post-descongelación

durante la criopreservación del esperma (Kumar et al., 2019). Al aumentar las cantidades de ROS puede dañar la membrana plasmática de los espermatozoides, que se desorganizarán y, en consecuencia, se inactivarán los receptores y enzimas asociadas (Medrano et al., 2017). Puede provocar efectos dañinos sobre la estructura y las funciones del esperma, incluida la peroxidación de lípidos, el daño del ADN y la apoptosis de los espermatozoides (Chlopik y Wysokinska, 2020). Otros efectos secundarios del estrés oxidativo por ROS son la pérdida de motilidad, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana mitocondrial (Agarwal et al., 2014). Las ROS producidas antes, durante o después de la criopreservación son responsables del estrés oxidativo de los espermatozoides (Medrano et al., 2017). La producción de radicales libres por los espermatozoides comienza durante la glicerolización y se intensifica después de la descongelación (Lucio et al., 2016). La formación de ROS se produce por la reducción del oxígeno (O_2) al recibir cuatro electrones, con la consiguiente formación de H_2O (Lucio et al., 2017). Las ROS está representado en general por radicales como el ion hidroxilo, superóxido, óxido nítrico, ion peroxilo y no radicales como peroxinitrato, ozono, oxígeno naciente y peróxido de hidrógeno (Kumar et al., 2019). En semen canino se ha observado que las especies reactivas de oxígeno más perjudiciales y tóxicas eran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ion hidróxido (OH^-) (Vieira et al., 2018).

Aunque los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo debido a la falta de antioxidantes para el citoplasma reducido, el estrés oxidativo leve se considera una respuesta fisiológica normal y es necesario para varias funciones de los espermatozoides, incluida la maduración, la capacitación y la hiperactivación de los espermatozoides, la reacción acrosómica y la fusión de espermatozoides y ovocitos (Kothari et al., 2010). La producción normal de ROS en el esperma está implicada en la activación de la motilidad aumentando la síntesis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y la fosforilación de proteínas (Aitken et al., 2012). Todas estas funciones están mediadas por la fosforilación cíclica de adenosina monofosfato y tirosina (Kothari et al., 2010). Sin embargo, las ROS deben inactivarse continuamente para mantener el equilibrio fisiológico celular (Medrano et al., 2017).

1.4.2. Estrés osmótico

Durante el ciclo de congelación-descongelación se generan importantes gradientes osmóticos locales a través de las membranas de los espermatozoides (Mazur et al., 1972). La adición de crioprotectores conduce a estrés osmótico, que depende de la permeabilidad relativa de un crioprotector en particular (Gao et al., 1993). Durante el proceso de criopreservación, las células se exponen a soluciones hipertónicas (Leibo, 1986). Las células inicialmente se encogen cuando se exponen a soluciones hipertónicas de crioprotectores permeables, recuperan su volumen isotónico original cuando el crioprotector ingresa a las células y luego se contraen nuevamente cuando el agua fluye fuera de las células durante la congelación. Durante la descongelación y la eliminación del crioprotector, la célula debe sufrir otra serie de cambios de volumen (Songsagen et al., 2002). Entonces cuando la reducción de la temperatura supera el punto de congelación del semen, el agua forma cristales de hielo primero en el compartimento extracelular. Esto aumenta la concentración de soluto en el agua libre no cristalizada fuera de la célula, lo que induce estrés hiperosmótico (Siemey et al., 2016). Sin embargo, durante la descongelación, los cristales de hielo se derriten en el agua libre que ingresa a la membrana plasmática, por lo que los espermatozoides sufren estrés hipoosmótico (Gloria et al., 2019). Para sobrevivir a la criopreservación, las células deben resistir estos cambios en la osmolalidad de los medios extracelulares, por lo que requiere una capacidad para regular el volumen celular que está relacionada con la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática del espermatozoide y del citoesqueleto (Peña, et al., 2012).

1.4.3. Estrés térmico

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico” (Quintanilla, 2018). El estrés por temperatura o choque por frío está relacionado con el cambio de fase en los lípidos y el estado funcional alterado de las membranas (Drobnis et al., 1993), ya que los estudios de fractura por congelación de las membranas antes, durante y después del enfriamiento

muestran claramente los eventos de separación de fases (De Leeuw et al., 1990). Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0 °C y cuya señal más evidente de choque de frío es la pérdida de motilidad que no se recupera calentando el semen (Quintanilla, 2018). También hay una disminución en la tasa de descomposición de la fructosa por los espermatozoides, una disminución en la absorción de oxígeno y una caída en ATP, que ya no será sintetizado y utilizado para suministrar energía para el mantenimiento de la motilidad (Mann y Lutwak-Mann, 2018). Las lesiones irreversibles asociadas al choque térmico resultan de un cambio de fase en los lípidos y el estado funcional alterado de las membranas (Kumar et al., 2019), es decir, disminución de la fluidez de la membrana y aumento de la permeabilidad de la membrana, daño acrosómico, deshidratación celular, liberación de enzimas y fosfolípidos, reducción de la actividad metabólica y disminución del consumo de ATP, todas estas son consecuencia del enfriamiento y congelación que pueden comprometer parcial o totalmente la fertilidad (Farstad, 1996). Los espermatozoides de perro son más resistentes al choque de frío que otras especies como el toro debido a una baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados/saturados unidos a fosfolípidos. Sin embargo, el semen canino congelado-descongelado posee baja viabilidad y motilidad después de la descongelación y tiene una mayor susceptibilidad a la disminución de la temperatura, el estrés osmótico, la toxicidad por crioprotectores y la formación de hielo intra y extracelular (Aitken, 2017 y Lucio et al., 2016).

1.5. Antioxidantes usados en la criopreservación de semen canino

La criopreservación del semen es el paso más importante de la inseminación artificial, que es una tecnología de la reproducción asistida mejor adoptada en la práctica canina (Abdillah et al., 2019). Como ya se había considerado anteriormente, por este proceso de criopreservación los espermatozoides sufren cambios a nivel estructural y molecular, lo que genera una reducción general de la fertilidad de los espermatozoides (Park et al., 2017). En tal sentido, se han utilizado diferentes tipos de diluyentes, se han realizado variaciones en los protocolos de congelación y la suplementación de antioxidantes a los diluyentes (Kim et al., 2019). Estos

antioxidantes que son agregados a los medios de congelación, proporcionan a los espermatozoides la capacidad de neutralizar compuestos oxidativos que se producen durante el proceso de congelación y descongelación (Martínez et al., 2020). Diversos estudios han demostrado la capacidad de distintos suplementos antioxidantes en soluciones de criopreservación para prevenir los daños causados por el estrés oxidativo en el espermatozoide de varias especies de mamíferos (Kawasaki et al., 2020). Entre estos antioxidantes se encuentran la *L-carnitina* (Agarwal y Said., 2004), la quercetina (Kawasaki et al., 2020), la catalasa, la Vitamina E, el ácido ascórbico (Farstad, 2009), la melatonina (Medrano et al., 2017), entre otros.

1.5.1. L- carnitina

1.5.1.1. Estructura y función metabólica

La *L-carnitina* es una amina cuaternaria, elaborada a partir de aminoácidos esenciales como lisina y metionina. Su función metabólica radica en transportar ácidos grasos de cadena corta, media y larga hacia las mitocondrias para la β -oxidación, dando como resultado la producción de ATP (Jeulin et al., 1987), por esta razón tiene un efecto benéfico sobre la motilidad, maduración y en realidad, en todo el proceso espermatogénico de los espermatozoides (Ramsay et al., 2001). Las *carnitinas* son una clase especial de nutrientes denominados, nutrientes “condicionalmente esenciales”, además de las propiedades descritas anteriormente, tienen la importante función de mantener la estabilidad de la membrana celular mediante la acetilación de los fosfolípidos de la membrana y las acciones anfílicas (Mingorance et al., 2011; Arduini et al., 1994). Evita además el deterioro del ADN inducido por los efectos nocivos de los radicales libres (Abdelrazik et al., 2009), funciona también como un almacén de acetilo para suministrar energía en las vías metabólicas de carbohidratos y lípidos (Infante et al., 2002).

La LC sirve como un vehículo intramitocondrial para el grupo acilo, que en forma de acil-CoA sirve como sustrato para el proceso de oxidación, generando energía tanto para la respiración como para la motilidad espermática (Aliabadi et al., 2012). Investigaciones han demostrado que la LC mantiene la energía celular, reduce el estrés oxidativo y minimiza la muerte celular por apoptosis, además minimiza los

daños patológicos de espermatozoides, el agotamiento del ATP que conduce a una fosforilación axonemal insuficiente, así como a la peroxidación de lípidos, dando como resultado la pérdida de la motilidad y viabilidad espermática (Dokmeci, 2005). Se ha demostrado que la LC dentro de sus propiedades como antioxidante incluye el aumento tanto de la actividad como de los niveles de otros antioxidantes como el superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Sarica et al., 2007).

Entre las propiedades antioxidantes de la LC, se incluye la protección contra las ROS. Existen estudios en donde se indica que la LC no solamente tiene influencia positiva en la motilidad, al actuar como antioxidante, sino también, puede tener un efecto crioprotector (Agarwal y Said, 2004). Es importante recalcar que la administración de LC en las muestras de espermatozoides puede generar efectos positivos en calidad de la cromatina y motilidad espermática y esto puede deberse a que pueden imitar la condición de los espermatozoides *in vivo* durante la espermatogénesis tardía (Aliabadi et al., 2012).

1.6. Capacidad fecundante en la fecundación *in vitro*

Se sabe muy bien que durante el proceso de criopreservación se producen ciertos perjuicios en la función espermática que dan como resultado una menor capacidad de fertilización y por ende bajas tasas de partos después de la inseminación artificial (Ledesma et al., 2015), por ello, evaluar el potencial de fertilidad de los espermatozoides es muy importante antes de realizar la inseminación artificial o la fertilización *in vitro* (FIV), de esta forma podemos asegurar resultados exitosos. La mayoría de métodos para valorar la capacidad fecundante *in vitro*, se basan en la medición de las características generales de los espermatozoides (motilidad, integridad de las membranas, integridad de orgánulos, integridad del ADN, etc.). Sin embargo, la relación entre la calidad de los espermatozoides, la evaluación entre las diferentes características ya mencionadas y la fertilidad varía mucho en los estudios realizados. La FIV es el método más adecuado y preciso para poder valorar la fertilidad, ya que de este modo se evalúa las interacciones espermatozoides-ovocito que ocurre durante la fertilización *in vivo*, permitiendo identificar las primeras etapas del desarrollo embrionario (Amiridis et al., 2000).

A menudo es complicado conseguir ovocitos de la misma especie, entonces, una alternativa es usar ovocitos de animales de laboratorio o especies domésticas, que se pueden obtener fácilmente, entre estas, ovocitos de animales de matadero. Es importante considerar que los estudios tienen que realizarse en ovocitos con zona pelúcida intacta, considerando que los ensayos realizados con ovocitos libres de zona pelúcida pueden considerarse incompletos para evaluar la capacidad fecundante, puesto que la fertilidad de los espermatozoides se puede describir como la capacidad del mismo para unirse y penetrar la zona pelúcida, realizar la fusión de su membrana con el oolema del ovocito, para lograr la formación del pronúcleo masculino y conducir a la escisión del cigoto. El uso de este tipo de estudios para evaluar la fertilidad puede ser una alternativa cuando se torna difícil obtener ovocitos de la misma especie (García et al., 2009)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Materiales Físicos

- Guantes de inspección
- Refrigerador
- Papel secante
- Mandil
- Jeringas 1 ml
- Hojas de bisturí No. 15
- Pajuelas de 0,25 ml
- Fundas Ziploc
- Caja poliestireno de 31 x 29 x 30 cm
- Rampa doble de congelación (24 y 10 cm de altura)

Materiales Biológicos

- Testículos de perro (con epidídimo intactos)
- Espermatozoides de perro
- Ovarios de vacas
- Ovocitos de vaca
- Huevos de gallina

Reactivos

- Tris (Sigma, 252859)
- Ácido cítrico (Sigma, C0759)

- Glucosa (Sigma, G5146)
- Penicilina G-sódica (Sigma, P3032)
- Sulfato de estreptomicina (Sigma, S9137)
- Glicerol (Sigma G9012),
- Sacarosa (Sigma, S1888)
- HEPES sodium salt (Sigma, H3784)
- Cloruro de sodio, NaCl (Sigma, S5886)
- Hidróxido de potasio; KOH (Sigma, P5958)
- Yoduro de Propidio (PI, Sigma P-4170)
- Aglutunina (PNA-FITC, Sigma L7381)
- Albúmina de suero bovino, BSA (Sigma, A9418)
- L-carnitina (LC, Sigma 8400920025)
- Hoechst 33342
- Nitrógeno Líquido (NL₂)
- BoviPure® (BP-100, Nidacon, Mölndal, Sweden)
- BoviDilute® (BD-100, Nidacon, Mölndal, Sweden)
- Medio para maduración *in vitro* - MIV (TCM-199, EPG y FCS)
- Medio para fecundación *in vitro* – FIV (FERT-TALP, 25 mM Bicarbonato de sodio, 22 mM lactato de sodio, 1 mM piruvato de sodio, 6 mg/mLBSA libre de ácidos grasos, y 10 µg/mL heparina)

Materiales de Laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas (2-10 μ L, 2 – 20 μ L, 20 – 200 μ L, y (100 – 1000 μ L)
- Cajas Petri de búsqueda
- Estereoscopio
- Centrífuga
- Sistema CASA, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.9, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Refrigerador
- Porta y cubre objetos cortos
- Termómetro para pajuelas
- Baño María
- Pinzas
- Guantes de nitrilo
- Tubos falcon de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Incubadora de CO₂, Memmert®

2.2. Métodos

2.2.1. El área de estudio

La obtención del material biológico como los testículos con sus epidídimos íntegros fueron recolectados de las campañas de esterilización realizadas por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en diferentes sectores de la ciudad de Cuenca; y de campañas de esterilización de Clínicas Veterinarias particulares y/o independientes. El trabajo experimental sobre la recuperación de espermatozoides, procesamiento, criopreservación y análisis espermático fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja Irquis (3° 04'48.1"S; 79°04'31.0"W).

Los ovarios bovinos fueron recolectados del Camal Municipal de la ciudad de Cuenca (EMARPLAG, *Empresa municipal pública de servicios de rastros y plaza de ganados*) y transportados al mismo Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal para las pruebas de fecundación *in vitro* heteróloga.

2.2.2. Unidad experimental y diseño experimental

En el experimento se conformaron 20 pools (agrupaciones) proveniente de 60 epidídimos de 30 perros machos adultos orquitectomizados. Cada pool se desarrolló a partir de espermatozoides de tres epidídimos recuperados por flujo retrógrado y seleccionados al azar. Cada pool se dividió en 2 alícuotas para la criopreservación mediante la congelación y vitrificación respectivamente. En el proceso de congelación se usó el diluyente TCG-EY + 5% de glicerol y se suplementó con 5mM (T1,) y 0 mM (T2, control 1) de L-*carnitina* y las muestras se congelaron en pajuelas de 0,25 mL usando vapores de NL₂ estático. En el proceso de vitrificación se usó el diluyente TCG-EY + 250 mM de sacarosa y se suplementó con 5 mM (T3) y 0 mM (T4, control 2) de L-*carnitina* y las muestras se vitrificaron sumergiendo gotas de 30 µL directamente en NL₂. Las muestras espermáticas tanto congeladas-descongeladas como vitrificadas-calentadas fueron evaluadas su cinemática, integridad de las membranas y capacidad fecundante.

La capacidad fecundante se evaluó mediante una Fecundación *in vitro* heteróloga usando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta y espermatozoides caninos epididimarios criopreservados de los tratamientos T1, T2, T3 y T4, después de ser sometidos a un proceso de selección espermática con gradientes de densidad de BoviPure (40%/80%). La capacidad fecundante de estos espermatozoides criopreservados se evaluó en la competencia que tuvieron los espermatozoides para unirse a los ovocitos, penetrarlos y formar pronúcleos (Figura 2).

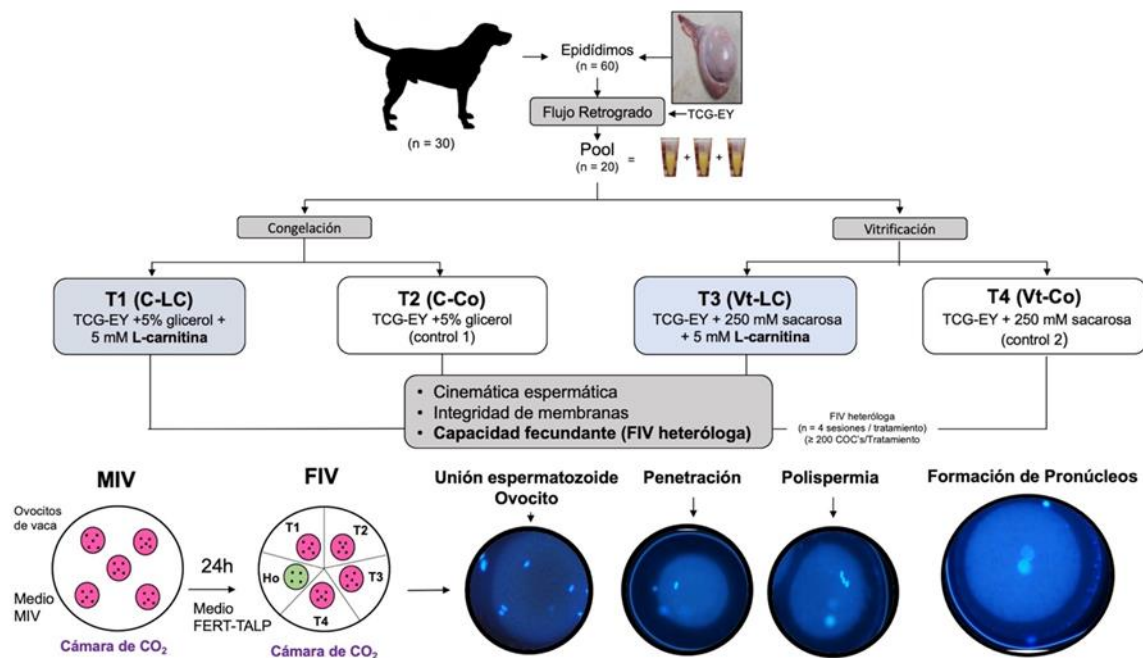


Figura 1. Diseño experimental

2.2.3. Elaboración de diluyentes y medios

El diluyente base que se usaron en este experimento fueron TCG (Tris, tes y glucosa) suplementado con el 20% (v/v) de yema de huevo. Lo que se detallan en las siguientes tablas:

Tabla 2. Diluyente base TCG

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomicina	300 mg
Agua milli Q	300 ml

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

Tabla 3. Diluyentes para congelación convencional (CC)

Fracción 1: TCG-EY	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ml
Yema de huevo inactivada a 56°C por 30 min.	20 ml (v/v)
<i>*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet</i>	
Fracción 2: TCG-EY + Gly	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	90 ml
Glicerol	10 ml (al 10% v/v)
Fracción 3: TCG-EY + Gly + LC	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	90 ml
L-carnitina (doble)	10 mM (145,07 mg)
Glicerol	10 ml (al 10% v/v)

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

Tabla 4. Diluyentes para vitrificación

Fracción 1: TCG-EY	
Reactivo	Cantidad
TCG	80 ml
Yema de huevo inactivada a 56° por 30 min.	20 ml (v/v)
<i>*Centrifugar a 4000 g por 10 min y eliminar el pellet</i>	
Fracción 2: TCG-EY + Sacarosa	
Reactivo	Cantidad
Fracción 1	100 ml
Sacarosa	250 mM (MW:342,3 g/mol) = 8,557 g
Fracción 3: TCG-EY + Sacarosa + LC	
Reactivo	Cantidad

Fracción 1	100 ml
L-carnitina (doble)	10 mM (145,07 mg)
Sacarosa	250 mM (MW:342,3 g/mol) = 8,557 g
pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg	

Tabla 5. HEPES para fluorescencia

Reactivo	Cantidad
Hepes sodium salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua milli Q	100 ml

Alícuotas en dosis 250 µl en tubos eppendorf de 1,5 ml y congelar a -20 °C hasta su uso

Tabla 6. Yoduro de propidio

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50 µl

Tabla 7. Aglutinina

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

Alícuotas en dosis de 50 µl

Tabla 8. Gradientes de densidad de BoviPure

Reactivo	Cantidad
Gradiente de 40%	
BoviPure	4 mL
BoviDilute	6 mL
Gradiente de 80%	
BoviPure	8 mL
BoviDilute	2 mL

Tabla 9. Medio MIV

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

EGF = *Epidermal growth factor*; FCS = *fetal calf serum*

Tabla 10. Medio FIV

Reactivo	Cantidad
FERT-TALP	Cantidad a requerir
lactato sódico	22 mM
Bicarbonato de potasio (NaHCO ₃)	25 mM
BSA sin ácidos grasos	6 mg/mL
Piruvato de sodio	1 mM
Heparina	10mg/mL

2.2.4. Metodología para la Investigación

Los medios que se usaron en esta investigación fueron fabricados en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Los reactivos para la elaboración de medios fueron de Sigma-Aldrich®, Merk® y Nicadon®.

Los testículos recolectados con sus epidídimos intactos fueron incluidos en esta investigación de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión experimento:

- Perros adultos (mayores de 1 año)
- Con madurez sexual desarrollada.
- Condición corporal entre 2,5 y 4 según la escala de 1 – 5 (siendo 1 flacura extrema y 5 obesidad extrema) (Baldwin et al., 2010; Dorsten y Cooper, 2004).

Criterios de exclusión experimento:

- Perros con problemas anatómicos (criptorquidia).

Esta información fue proporcionada al momento de la castración por parte de los estudiantes.

2.2.4.1. Recuperación espermática y agrupaciones (pools)

En cada sesión, los testículos se recolectaron por orquiectomía bilateral extirpando túnica vaginal y albugíneas, y manteniendo intacto el conducto deferente en su porción proximal (aproximadamente 1 cm). Los testículos se almacenaron en bolsas plásticas ziploc (a 22°C). Estas bolsas con testículos fueron selladas, identificadas (especificando si es derecho o izquierdo) y almacenadas en una caja de poliestireno con hielo a una temperatura entre 4 – 5 °C para conservar hasta 96 horas.

En el laboratorio, los testículos se lavaron con solución fisiológica refrigerada (5 °C) y se trabajó rápidamente a temperaturas inferiores a 10 °C (recomendable 5°C). Se usaron agujas de 20 x 1 ½' recortada su punta (punta roma). La recuperación de espermatozoides epididimarios se realizó mediante flujo retrógrado que consistió en introducir la aguja a través del conducto deferente y administrar 1 mL de TCG-EY. Cuando existió una marcada presión en la cola del epidídimo, se realizaron varios cortes transversales (slicing) y el contenido lechoso fue recuperado en una caja de búsqueda cuadrículada. Inmediatamente, este contenido líquido fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y almacenado en refrigeración hasta su procesamiento.

Las muestras recuperadas de cada epidídimo (izquierdo y derecho) fueron analizadas la motilidad subjetiva y score (1 a 5, considerando 1 como una trayectoria con progresividad mala y 5 trayectoria con progresividad alta) mediante una observación directa en un microscopio de contraste de fases. Aquellas muestras epididimarias que tuvieron una motilidad y score superior al 60 % y 2,5 respectivamente, fueron usados para la conformación de pools. En consecuencia, se conformaron pools mediante la agrupación al azar de 3 muestras de epidídimos (izquierdo o derecho, independientemente) en un tubo Falcon de 15 ml y fueron mantenidos a temperatura de refrigeración a 5°C hasta su análisis inicial y

procesamiento. Cada pool fue evaluado el volumen inicial y concentración espermática. El volumen se evaluó directamente en los tubos Eppendorf de 1,5 mL graduados con la ayuda de la pipeta de 1000 μ L; y la concentración fue evaluada por conteo celular en la cámara de Neubauer.

2.2.4.2. Suplementación de L-carnitina a diluyentes y tratamientos

Cada pool conformado fue dividido inicialmente en 2 alícuotas de igual volumen. La primera alícuota fue usada para la congelación y la segunda para la vitrificación, respectivamente. En cada caso, cada alícuota se subdividió en dos grupos para conformar cuatro tratamientos según el método de criopreservación (congelación y vitrificación) y la adición o no de 5 mM de L-carnitina:

Para congelación:

- Tratamiento 1. (C-LC) TCG+20% YH+5% Gly + 5 mM L-carnitina,
- Tratamiento 2. (C-Co) TCG+20% YH+5% Gly (control 1).

Para vitrificación:

- Tratamiento 3. (Vt-LC) TCG+20% YH+250 mM sacarosa + 5 mM L-carnitina,
- Tratamiento 4. (Vt-Co) TCG+20% YH+250 mM sacarosa (control 2)

Para llegar a las concentraciones finales de los agentes crioprotectores glicerol y sacarosa (penetrante y no penetrante, respectivamente) nos basamos según lo detallado por Galarza et al. (2021).

2.2.4.3. Criopreservación de espermatozoides

Los procedimientos de criopreservación, que incluyeron la congelación - descongelación y vitrificación - calentamiento, se realizaron usando 1,7 L de nitrógeno líquido (NL_2) contenido en una caja de poliestireno de 31 x 29 x 30 cm (largo, ancho y alto) y usando una rampa doble de congelación.

2.2.4.3.1. Congelación convencional (CC)

La primera alícuota de cada pool de semen diluido con TCG-EY fue subdividido en dos alícuotas de igual volumen.

Ambas sub-alícuotas fueron diluidas por separado con la Fracción 1 (TCG-EY) del diluyente de congelación (Tabla 2) a una concentración inicial de 100×10^6 espermatozoides/mL y se mantuvieron en refrigeración a 5°C durante 1 hora. A partir de entonces la primera y segunda sub-alícuotas se diluyeron en igual volumen (1 mL + 1 mL) con la Fracción 2 (doble de glicerol [10%]) y Fracción 3 (doble de glicerol [10%] y doble de L-carnitina [10mM]) de los diluyentes de congelación para alcanzar concentraciones finales de 50×10^6 espermatozoides/mL, 5% de glicerol, y ya sea con: 0 (C-Co) o 5 mM de L-carnitina (C-LC). Estos tratamientos se mantuvieron durante 1 hora más en equilibrio a 5°C. Al final de este período, las muestras espermáticas se cargaron en pajuelas de 0,25 mL previamente enfriadas (5°C) y rotuladas, y se sellaron con alcohol polivinílico y se congelaron en vapores de NL₂ estático. Para este propósito, usamos una caja de poliestireno de 31 x 29 x 30 cm (largo, ancho y alto, respectivamente) contenido con 1,7 L de NL₂ (equivalente a 2 cm de altura) y una rampa doble de congelación. Inicialmente las pajuelas se colocaron en la rampa superior que se estaba a 24 cm del nivel de NL₂ y se mantuvo durante 1 minuto; por consiguiente, las pajuelas fueron bajadas a la rampa inferior que se encontraba a 10 cm del nivel de NL₂ y se mantuvo también durante 1 minuto. Finalmente, las pajuelas se sumergieron directamente en el NL₂ y se almacenaron a -196 °C hasta su descongelación y análisis posterior. La descongelación de las pajuelas se realizó sumergiéndolas en agua a temperatura 37°C en un baño María durante 30 segundos. Después de ello, las muestras descongeladas fueron evaluadas su cinemática y el estado de las membranas espermáticas (ver más abajo).

2.2.4.3.2. Vitricación (Vt)

La primera alícuota de cada pool de semen diluido con TCG-EY fue subdividido en dos alícuotas de igual volumen. Ambas sub-alícuotas se diluyeron por separado con la Fracción 1 (TCG-EY) del diluyente de vitricación (Tabla 3) a una concentración

inicial de 100×10^6 espermatozoides/mL. A partir de entonces la primera y segunda sub-alícuotas se diluyeron en igual volumen (1 + 1 mL) con la Fracción 2 (doble de sacarosa [500 mM]) y Fracción 3 (doble de sacarosa [500 mM] y doble de L-carnitina [10mM]) respectivamente, de los diluyentes de vitrificación, alcanzando concentraciones finales de 50×10^6 espermatozoides/mL, 250 mM de sacarosa, y ya sea 0 (Vt-Co) o 5 mM de L-carnitina (Vt-LC). Estos tratamientos se mantuvieron durante 30 minutos en equilibrio a 5°C desde su dilución inicial (Fracción 1). Para la vitrificación se usó la misma caja de poliestireno contenido con 4 cm de NL₂ desde su base interior. Posteriormente, estas muestras se cargaron con una Pipeta de 1000 µL con punta azul recortada de tal manera que permitió generar gotas de 30 µL y se le dejó caer directamente sobre el NL₂ a una altura de 15 cm aproximadamente. Los pellets se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL sumergidos en NL₂. El calentamiento se realizó colocando los pellets en vasos de precipitación de 20 ml mantenidos en un baño María atemperado a 65°C. Rápidamente, cuando los pellets se derritieron, el contenido se recogió con la pipeta de 1000 µl y se transfirió en un tubo Eppendorf de 1,5 ml a 37°C. Después del calentamiento, los espermatozoides se centrifugaron durante 5 min a $300 \times g$. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de TCG-EY para reconstituir las muestras. Después de ello, las muestras calentadas fueron evaluadas su cinemática y el estado de las membranas espermáticas (ver más abajo).

2.2.4.4. Análisis de calidad espermática

2.2.4.4.1. Parámetros cinéticos

Las características cinéticas de espermatozoides epididimarios frescos-diluidos, congelados-descongelados y vitrificados-calentados fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.0.4.9 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10 X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/s). Para este propósito se colocó una gota de 5 µL (con una concentración

ajustada a 10×10^6 espermatozoides/mL) y se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio (VAP, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

2.2.4.4.2. Estado de membranas espermáticas

El estado de la membrana plasmática y del acrosoma se evaluó mediante la prueba de doble tinción fluorescente ‘yoduro de propídio’ (PI, Sigma P4170) y ‘aglutinina (*Arachis hypogaea*) conjugada con isotiocianato de fluoresceína’ (PNA-FITC, Sigma L7381), según lo detallado por Galarza et al. (2021). Se examinaron un total de 200 espermatozoides por portaobjetos utilizando un microscopio de luz de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. Nueva York, NY, EE. UU.) con un filtro de paso de triple banda (aumento de 40 X con una excitación: 450– 490 nm, y emisión: 520 nm) y se cuantificaron cuatro subpoblaciones de células: (1) membrana plasmática intacta/acrosoma intacto (IPIA); (2) membrana plasmática intacta/acrosoma dañado (IPDA); (3) membrana plasmática dañada/acrosoma intacto (DPIA); y (4) membrana plasmática dañada/acrosoma dañado (DPDA). Además, se calculó el porcentaje total de células que presentan membrana plasmática intacta equivalente a espermatozoides vivos (IPM: IPIA + IPDA) y membrana acrosomal intacta (IAM: IPIA + DPIA).

2.2.4.5. Evaluación de la capacidad fecundante

Para la evaluación de la capacidad fecundante se realizó una fecundación *in vitro* (FIV) heteróloga usando ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta y células de la granulosa intacta y espermatozoides caninos congelados - descongelados y vitrificados – calentados suplementados o no con 5 mM de L-carnitina, según lo detallado por Galarza et al. (2019) con algunas modificaciones. Brevemente, la maduración *in vitro* (MIV) de complejo cúmulo-ovocito (COC) bovinos provenientes de ovarios recuperados de matadero, se realizó en gotas de 60 μl (30 COC por gota) de medio de maduración (TCM-199) suplementado con 10 ng/mL de EGF, 25 $\mu\text{g/mL}$

FHS (Folltropin), 1 $\mu\text{g/mL}$ de Estradiol, cisteamina 100 mM, y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS), durante 24 horas a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 y máxima humedad (92%). Este procedimiento fue realizado en una cámara de CO_2 , Memmert® (ICO105).

Después de 24 horas, los ovocitos maduros se lavaron dos veces en medio de fertilización “FERT” (medio FERT-TALP suplementado con bicarbonato 25 mM, lactato sódico 22 mM, piruvato sódico 1 mM, BSA libre de ácidos grasos 6 mg/mL y heparina 10 $\mu\text{g/mL}$) y fueron transferidos a gotas de 30 μL de medio FERT (30 COC por gota). Para la FIV heteróloga, se realizó un conjunto de muestras de semen canino de los cuatro grupos experimentales (C-LC, C-Co, Vt-LC y Vt-Co) más un grupo control utilizando espermatozoides congelado-descongelado de un solo toro de fertilidad probada. Las muestras de semen canino de los grupos C-LC y C-Co se descongelaron a 37 °C durante 30 segundos y las muestras de los grupos Vt-LC y Vt-Co se calentaron a 65°C durante 5 segundos y entonces se transfirieron a 37°C. Este espermatozoides epididimario se mantuvo por 20 minutos a 37°C antes de la selección de los espermatozoides.

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

Para la FIV, los espermatozoides seleccionados y capacitados se diluyeron finalmente en medio FERT a una concentración de 2×10^6 espermatozoides/mL y

de esa dilución se agregó 30 μL cada gota de fertilización para obtener una concentración final de 1×10^6 espermatozoides/mL. En cada réplica de FIV se probaron cuatro grupos heterólogos en donde se usó esperma canino criopreservado y un grupo de control homólogo en el cual usó esperma bovino. Se realizaron un total de 4 sesiones de FIV con todos los grupos y en cada sesión y en cada grupo se colocará un mínimo de 15 COCs madurados *in vitro*. Los gametos (espermatozoides y óvulos) se incubaron conjuntamente a $38,5^\circ\text{C}$ en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire con humedad máxima (92%).

La capacidad fecundante de los espermatozoides congelados – descongelados y vitrificados. – calentados, finalmente, se evaluó por la capacidad para unirse a la zona pelúcida, penetrarlos y formar pronúcleos. La formación de pronúcleos fue considerada cuando se observó dos pronúcleos (masculino y femenino); sin embargo, en la polispermia se consideró cuando existió más de dos pronúcleos formados o más de dos espermatozoides penetrados. Para estas evaluaciones, los ovocitos puestos en 2 mL de PBS previamente atemperado a $38,5^\circ\text{C}$ se agitaron con un vórtex durante 3 min, se fijaron y se tiñeron con Hoechst 33342,), posteriormente se evaluó con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (UV 2E/C, excitación: 340-380 nm, emisión: 435-485 nm), todo esto a las 24 horas post inseminación.

2.3. Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizaron estadísticamente en un software STATISTICA para Windows, versión 12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Los datos fueron expresados en media $\pm$ SEM (error estándar de la media). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro-Wilk para determinar la normalidad. Cuando los datos no cumplieron una distribución normal, las variables porcentuales fueron convertidas al *Arcoseno* y las variables numéricas se transformaron al *Log-10*. Un ANOVA unidireccional utilizando el procedimiento de modelo lineal general GLM) fue usado para determinar las diferencias significativas entre las muestras de esperma fresco-diluido (sin congelar), congelado-descongelado y vitrificado-

calentado en las variables cinéticas, integridad de las membranas espermáticas y capacidad fecundante. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores fueron comparados mediante la prueba de rango múltiple de Tukey a un nivel de significancia de $P < 0.05$. Finalmente, se usó la prueba de Correlación de Pearson para medir la asociación significativa ($P < 0,10$) entre las variables cinemáticas de progresividad (MT, MP, VCL, VSL, STR y LIN) y el porcentaje de fertilidad equivalente a formación pronuclear, por cada tratamiento.

3. RESULTADOS

3.1. Parámetros cinéticos

En general, a excepción de los parámetros de relación de progresividad (STR, LIN y WOB), los parámetros cinéticos fueron afectados por el proceso de criopreservación al mostrar una reducción significativa ($P < 0,05$) de sus valores con respecto a las muestras frescas, independientemente del método usado (congelación o vitrificación) o de la adición de la *L-carnitina*.

Las muestras congeladas con LC (C-LC) mostraron porcentajes más altos ($P < 0,05$) de MT en comparación con aquellas muestras vitrificadas control (Vt-Co) ($39,0 \pm 1,74\%$ vs. $30,3 \pm 1,05\%$), respectivamente. En este mismo sentido, a pesar de que los valores fueron bajos, las muestras congeladas con (C-LC) o sin (C-Co) *L-carnitina* produjeron una MP más alta ($P < 0,05$) comparado con las muestras vitrificadas control, Vt-Co ($7,0 \pm 1,12\%$ y $7,7 \pm 1,05\%$ vs. $2,3 \pm 0,53\%$, respectivamente) (Figura. 2).

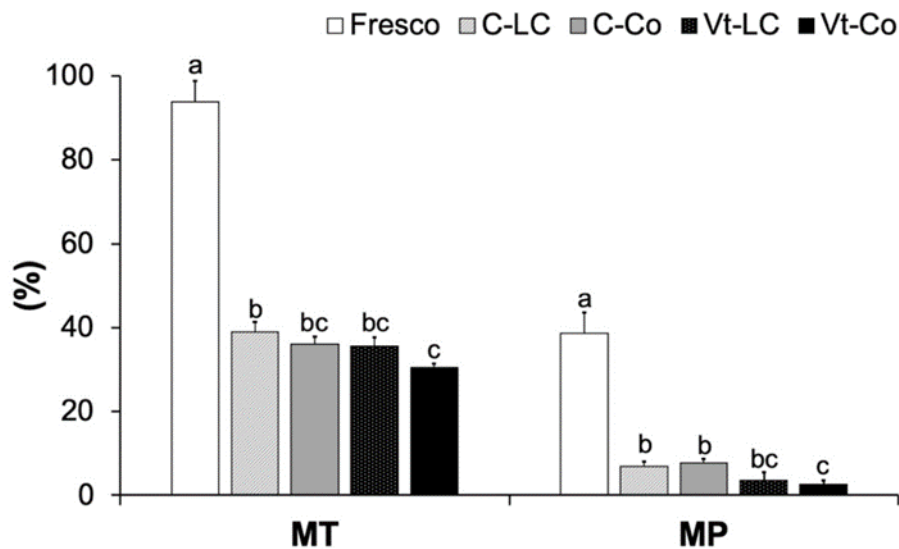


Figura 2. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin *L-carnitina*. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$).

Las VCL post-criopreservación de muestras congeladas con o sin LC fueron mayores ($P < 0,05$) que aquellas muestras vitrificadas con o sin LC. Asimismo, la VAP post-criopreservación de muestras C-Co fue mayor ($P < 0,05$) que aquellas muestras Vt-co. De la misma manera, la VSL post-criopreservación de muestras congeladas o no con LC fueron mayores ($P < 0,05$) que aquellas muestras vitrificadas control. En los parámetros de relación de progresión (SRT, LIN y WOB) no se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos después de la criopreservación (Figura 3).

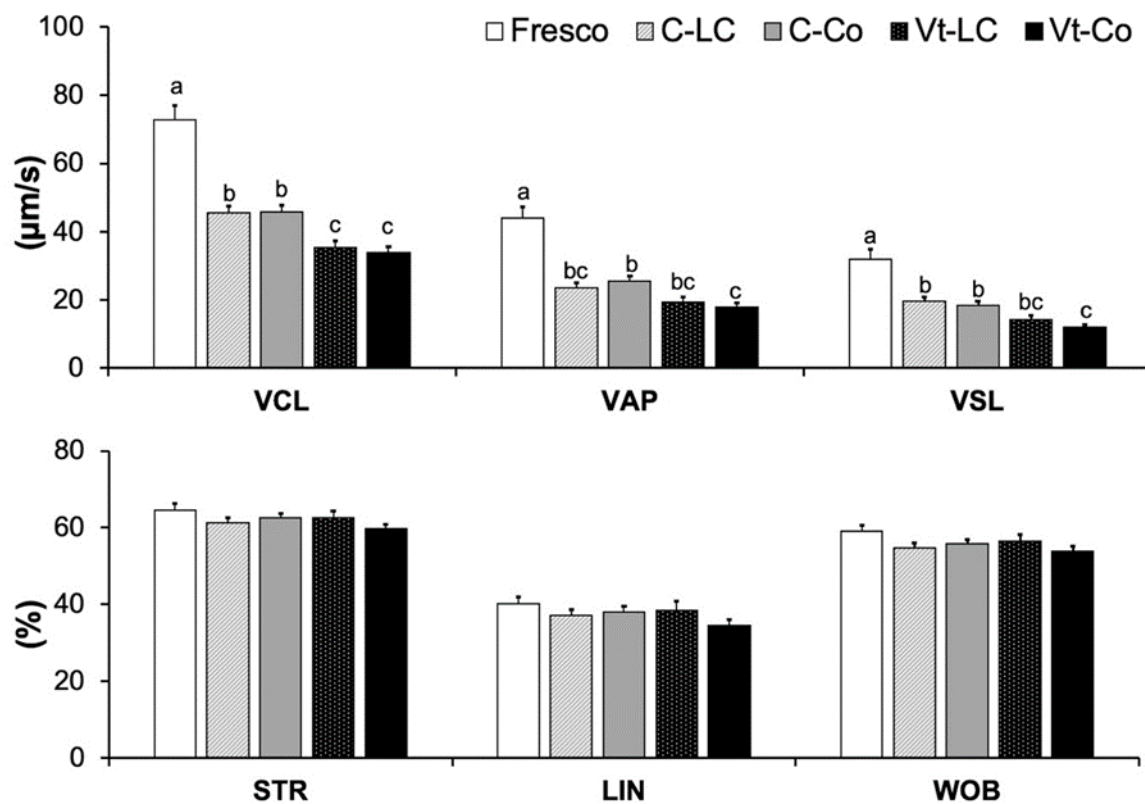


Figura 3. Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) y parámetros de relación de progresividad rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin L-carnitina Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$).

La ALH post-criopreservación de muestras C-Co fue mayor ($P < 0,05$) que las muestras Vt-Co. Finalmente, las muestras congeladas con LC produjeron mayores

($P < 0,05$) valores de BCF que aquellas muestras vitrificadas con o sin *L-carnitina* (C-LC= $4,9 \pm 0,30$ Hz vs. Vt-LC= $3,6 \pm 0,27$ hz h Vt-Co= $3,5 \pm 0,27$ Hz) (Figura 4).

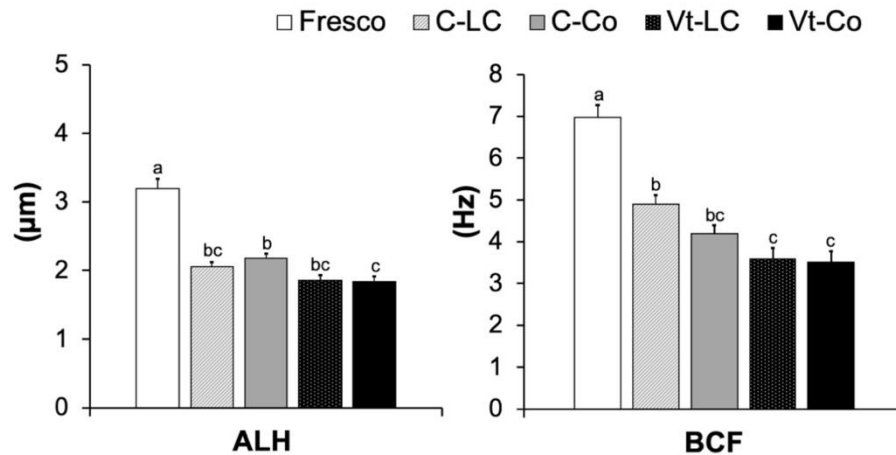


Figura 4. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de muestras congeladas y vitrificadas con o sin *L-carnitina*. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$).

3.2. Estado de membranas espermáticas

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal disminuyeron ($P < 0,001$) significativamente después del proceso de congelación o vitrificación, independientemente de la adición de *L-carnitina*.

El análisis simultáneo de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal evidenció mayores porcentajes de IPIA en muestras congeladas y vitrificadas con *L-carnitina* comparadas con sus contrapartes controles (C-LC= $37,9 \pm 1,41\%$ y Vt-LC= $39,4 \pm 1,62\%$ vs. C-Co= $33,1 \pm 1,20\%$ y Vt-Co= $32,6 \pm 1,80\%$). En el mismo sentido, la integridad total de la membrana plasmática (IMP) fue superior ($P < 0,05$) en muestras congeladas y vitrificadas con *L-carnitina* comparadas con las muestras vitrificadas control (C-LC= $40,7 \pm 1,91\%$ y Vt-LC= $40,4 \pm 1,54\%$ vs. Vt-Co= $34,7 \pm 1,02\%$). Finalmente, la integridad de la membrana acrosomal no evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos después de la criopreservación (Figura 5).

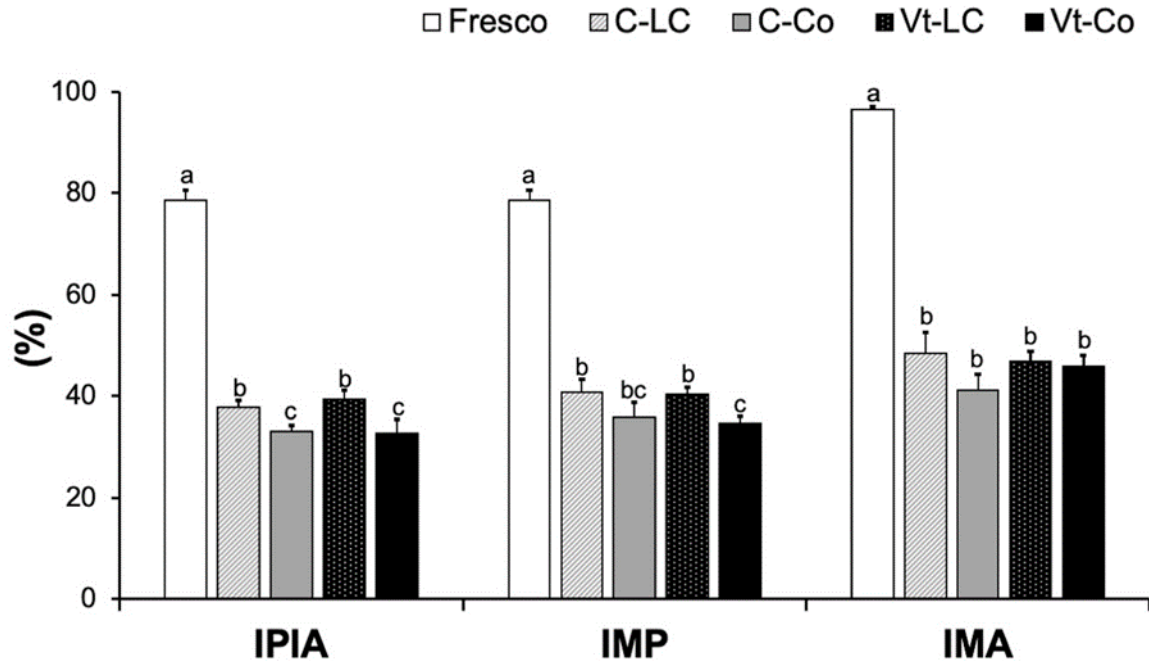


Figura 5. Estados de las membranas espermáticas de muestras congeladas y vitrificadas con o sin *L-carnitina*. IPIA, membrana plasmática íntegra y acrosoma íntegro; IMP, integridad total de membrana plasmática; e IMA, integridad de membrana acrosomal. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b – c, $P < 0,05$).

3.3. Capacidad fecundante

La unión espermatozoides-ovocitos post FIV fue, en general, baja en todos los tratamientos sin evidenciar diferencias significativas ($P > 0,05$); sin embargo, todos esos valores fueron significativamente inferiores en comparación con su contraparte control homóloga (Ho) (C-LC= $0,40 \pm 0,10$; C-Co= $0,27 \pm 0,10$; Vt-LC= $0,02 \pm 0,01$; y Vt-Co= $0,04 \pm 0,02$ frente a Ho= $12,5 \pm 0,97$). El porcentaje de poliespermia fue superior ($P < 0,05$) en ovocitos penetrados y fecundados con el grupo C-Co comparado con los ovocitos del grupo Vt-Co. Finalmente, el porcentaje de ovocitos penetrado, fertilizados y que formaron pronúcleos fue superior con las muestras espermáticas congeladas con *L-carnitina* (C-LC) que con muestras vitrificadas sin *L-carnitina* (Vt-Co) (C-LC= $69,2 \pm 2,46\%$ vs. $61,0 \pm 1,51\%$) (Figura 6).

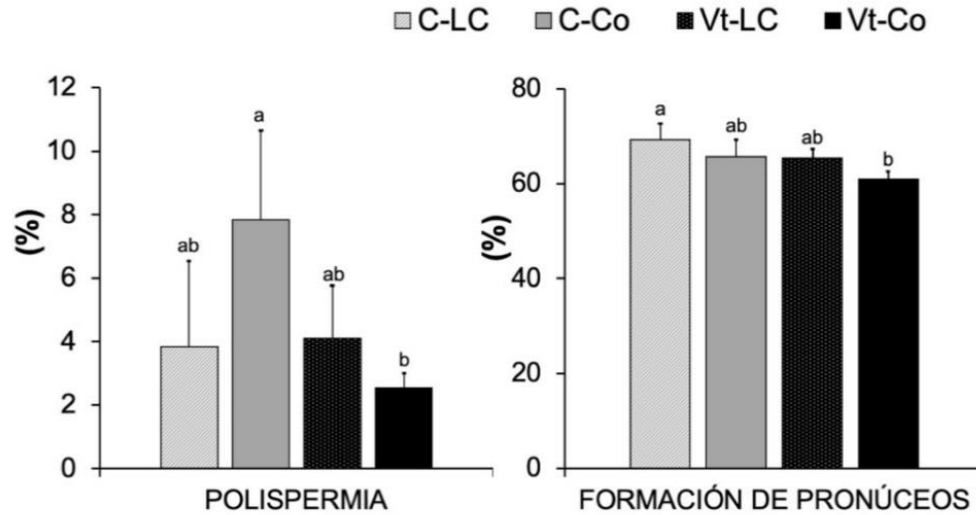


Figura 6. Poliespermia y formación de pronúcleos. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b, $P < 0,05$).

3.4. Correlación entre variables cinemáticas y formación de pronúcleos

La correlación de las variables de progresividad y la fertilidad expresada en la capacidad que tuvieron los espermatozoides caninos congelados y vitrificados (con o sin *L-carnitina*) para penetrar, fecundar y formar pronúcleos están detallados en la Tabla 11.

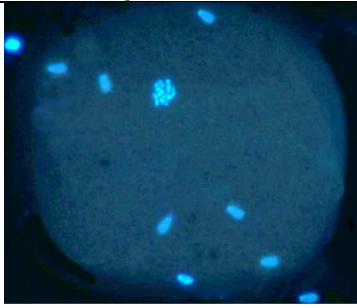
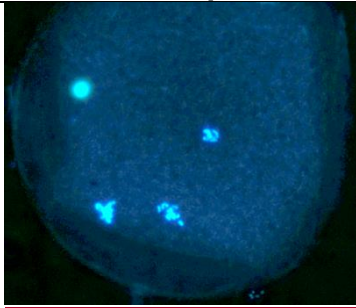
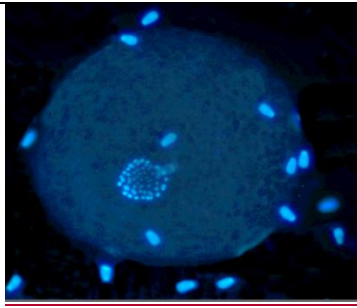
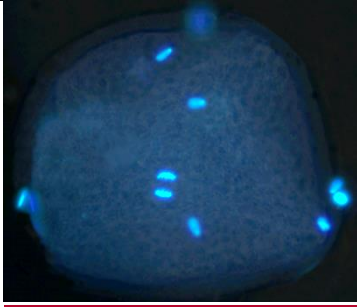
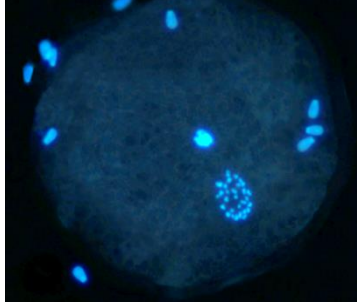
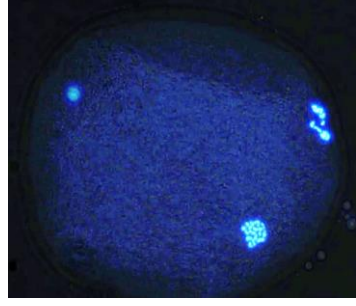
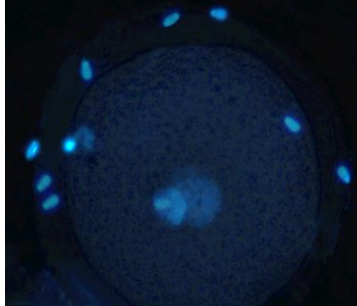
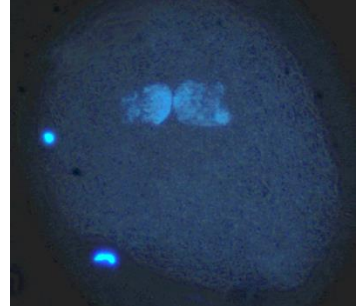
En el análisis de las muestras congeladas con *L-carnitina* (C-LC) mostraron una baja correlación ($P < 0,10$) entre los parámetros cinemáticos de progresividad (MT, MP, VSL y LIN) y la formación pronuclear. Asimismo, el Tratamiento de vitrificación con *L-carnitina* (Vt-LC) mostró una correlación media ($P < 0,10$) entre la motilidades total y progresiva y la formación pronuclear. No obstante, sus contrapartes controles tanto en la congelación como vitrificación (C-Co y Vt-Co) no mostraron ninguna correlación significativa ($P > 0,10$) entre parámetros cinemáticos y formación pronuclear (ver Tabla 11).

Tabla 11. Correlación entre variables cinemáticas y el porcentaje de formación pronuclear de los cuatro tratamientos en estudio

Variable cinemática progresiva	Tratamientos							
	C-LC		C-Co		Vt-LC		Vt-Co	
	r	P	r	P	r	P	r	P
MT (%)	0,2609	0,062	0,0933	0,515	-0,4254	0,069	-0,1215	0,642
MP /%)	0,2353	0,093	-0,0381	0,791	-0,5564	0,013	-0,1231	0,638
VCL (µm/s)	0,1461	0,301	-0,1581	0,268	-0,3131	0,192	-0,2869	0,264
VSL (µm/s)	0,2350	0,093	-0,0474	0,741	-0,3268	0,172	-0,0443	0,866
STR (%)	0,1330	0,347	0,0481	0,738	0,0605	0,806	0,1357	0,604
LIN (%)	0,2637	0,058	0,1187	0,407	0,1137	0,643	0,0492	0,851

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

Tabla 12. Interacción espermatozoide-ovocito y formación de pronúcleos en cada uno de los tratamientos y, en la FIV homóloga.

Tratamiento	Interacción espermatozoide-ovocito		Formación de pronúcleos	
T1: FIV heteróloga con L-carnitina (congelación).				
T2: FIV heteróloga sin L-carnitina (congelación).				
T3: FIV heteróloga con L-carnitina (vitrificación).				
T4: FIV heteróloga sin L-carnitina (vitrificación).				
FIV homóloga.				

4. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte en informar el efecto de la suplementación con *L-carnitina* a un diluyente TCG-EY sobre la calidad de espermatozoides epididimario canino congelado y vitrificado, y su capacidad de fertilización. Los resultados demostraron que el proceso de congelación-descongelación produjo una mayor cinemática (ej. MT, MP, VCL y VSL) e integridad de membranas en comparación con el proceso vitrificación-calentamiento, independientemente de la suplementación con *L-carnitina*. Este estudio es consistente con los hallazgos evidenciados por Galarza et al. (2021) donde demostraron que después de la congelación ultrarrápida (o vitrificación usando TCG-EY + 250 mM de sacarosa) produjo un menor porcentaje de motilidad total y progresiva. Además, los resultados indican que dicha suplementación con *L-carnitina* produjo un efecto crioprotector debido a un mejoramiento de la integridad simultánea de las membranas plasmáticas y acrosomal después de la descongelación o calentamiento de las muestras congeladas o vitrificadas, respectivamente. Por otro lado, no se observó diferencia en cuanto a la capacidad fecundante (*in vitro*) de los espermatozoides congelados y vitrificados con o sin *L-carnitina*.

Todo proceso de congelación o vitrificación afecta negativamente los parámetros que determinan la calidad espermática (Qamar et al., 2020). Esto se debe, principalmente a factores como el choque de frío y el estrés oxidativo, asociado con la peroxidación de lípidos (Budai et al., 2014; Qamar et al., 2020) que degeneran la integridad del espermatozoide. Los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación sufren daños afectando tanto la viabilidad, motilidad, integridad de membranas y cromatina (Fraser y Strzezek, 2007). El presente estudio es consistente con los trabajos anteriormente descritos debido a la reducción de varios parámetros cinéticos. La integridad simultánea de membrana plasmática y acrosomal (IPIA) demostró que la *L-carnitina* ejerció su rol crioprotector después de los procesos de congelación y vitrificación en comparación con sus controles.

La suplementación con antioxidantes (o aditivos) al medio de criopreservación

son necesarios para reducir estrés oxidativo (El Raey et al., 2016; Martínez et al., 2020). La *L-carnitina* posee propiedades estimulantes de la locomoción, antioxidantes y crioprotector (Jeulin et al., 1987). La *L-carnitina* facilita el transporte de ácidos grasos de cadena corta, media y larga hacia el interior de las mitocondrias y contribuye a la β -oxidación y generación de energía fácilmente disponible en forma de ATP (Jeulin y Lewin, 1996; Ramsay et al., 2001). Por lo tanto, tiene un efecto positivo en la motilidad y parámetros cinemáticos de los espermatozoides (Galarza et al., 2020; Kolster, 2018), demostrándose este efecto en el semen de perro (Kmenta et al., 2011; Farstad, 2009).

La adición de *L-carnitina* a medios de congelación espermática ha sido demostrada en humanos (Banihani et al., 2014), rumiantes (Hufana-Duran et al., 2017; El Raey et al., 2016) y ratones (Aliabadi et al., 2012). Estos trabajos indican que el efecto benéfico de la *L-carnitina* puede atribuirse a una mayor producción de ATP junto a la función antioxidante. No obstante, en el presente estudio, la adición de 5 mM de *L-carnitina* al diluyente base TCG-EY no mostró un efecto benéfico sobre los parámetros cinemáticos. Si bien, este trabajo no evaluó la integridad y función de la membrana mitocondrial que determina la producción de energía (ATP) y vigor cinético en los espermatozoides (Celeghini et al., 2007), estos resultados demostraron una drástica reducción de los parámetros cinemáticos (MP, VCL, ALH y BCF) después de ambos métodos de criopreservación.

Otros estudios realizados por De Souza et al. (2019) y Bucak et al. (2010) suplementaron con 2,5; 5 o 10 mM de *L-carnitina* a diluyentes basados en TCG-EY y no encontraron un efecto beneficioso consistente sobre la congelación-descongelación de semen de carnero o chivo. Estos autores hipotetizan que la *L-carnitina* no contribuyó a la β -oxidación ni mejoramiento de cinemática debido a factores relacionados con la especie o dosis. Nuestros resultados son consistentes con los resultados de los estudios mencionados anteriormente. Nosotros exponemos que factores como la especie (canina), tipo de diluyente, dosis de *L-carnitina* y método de criopreservación pueden haber limitado el efecto de la *L-carnitina*, como fue previamente demostrado por Kmenta et al. (2011). Por otro lado, Galarza et al. (2020) demostró que la adición de 5 a 10 mM de *L-carnitina* al

diluyente a base de leche desnatada y yema de huevo (UHT) mejoró sorprendentemente las motilidades, velocidades e integridad de membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial de espermatozoides de carnero refrigerados durante 96 horas.

Después del proceso de congelación o vitrificación, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal disminuyeron significativamente ($P < 0,001$) en relación a sus valores antes de la criopreservación con o sin la adición de *L-carnitina*, este resultado es similar a los de otro trabajo realizados en gatos (Manne-In et al., 2014) en donde los espermatozoides de acrosoma intacto, post-descongelación se redujeron en todos los grupos de tratamientos (*L-carnitina* 0 mM, 12,5 mM, 25 mM y 50 mM), demostrando así que la suplementación *L-carnitina* a los diluyentes de criopreservación, no puede proteger el daño de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides. Satisfactoriamente, nuestro trabajo evidenció un efecto crioprotector de la *L-carnitina* debido a un incremento significativo de la integridad simultánea de la membrana plasmática y acrosomal (IPIA) después de los procesos de congelación y vitrificación comparadas con sus grupos controles. De hecho, después de vitrificar muestras espermáticas con *L-carnitina*, se obtuvo un incremento significativo la integridad total de la membrana plasmática IMP (equivalente a la viabilidad) comparada con su contraparte control. Estos hallazgos demuestran que la *L-carnitina* ejerció su rol crioprotector en espermatozoides epididimarios caninos congelados o vitrificados con TCG-EY. En un estudio en búfalos se demostró los efectos antioxidantes y crioprotector de la *L-carnitina* al mejorar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides después de la congelación (Longobardi et al., 2017). Estos autores sugieren que la *L-carnitina* produjo un rol antioxidante contra las ROS tóxicas promoviendo de esta manera la estabilidad de la membrana como ha sido demostrado previamente por El-Raey et al. (2016).

Por otro lado, se ha demostrado los efectos crioprotectores de la *L-carnitina* en espermatozoides congelados-descongelados al mejorar la motilidad y la viabilidad (equivalente a la integridad de la membrana plasmática) (Banihani et al., 201; El Raey et al., 2016, Fattah et al., 2017 Hufana-Duran et al., 2017). El rol crioprotector

de la L-*carnitina* se ha atribuido a la reducción del estrés oxidativo y del daño al ADN espermático durante y después de la criopreservación (Berni et al., 2008; Abdelrazik et al., 2009; Thangasamy et al., 2009). De hecho, la suplementación de 12,5 – 50 mM de L-*carnitina* al medio de congelación ha permitido mejorar la motilidad y la viabilidad de espermatozoides epididimarios de gato (Manee et al., 2014). Se ha sugerido que la L-*carnitina* también puede estabilizar la membrana plasmática de los espermatozoides, posiblemente a través de la interacción con los fosfolípidos de la membrana, que modulan la fluidez de la membrana plasmática (Daena et al., 1984). Este fenómeno puede permitir que los espermatozoides resistan daños durante la criopreservación. Por lo tanto, esta mejora en la integridad y funcionalidad de los espermatozoides podría resultar en mejores características de los espermatozoides, como la motilidad. El presente estudio es consistente con los estudios descritos anteriormente al evidenciar el mejoramiento de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, sin embargo, la motilidad y cinemática no fue mejorada. Además, para nuestro mejor conocimiento, este estudio constituye el primer reporte del uso de la L-*carnitina* en espermatozoides epididimarios caninos sometidos a un proceso de vitrificación.

Para probar la capacidad fertilizante del espermatozoides canino congelado-descongelado y vitrificado-calentado se utilizó la fecundación *in vitro* heteróloga. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la accesibilidad a ovocitos homólogos adecuados (es decir, de perras adultas) puede ser limitada, como fue en este caso. Por lo tanto, el uso de FIV heteróloga con ovocitos bovinos con zona pelúcida intacta fue utilizada como herramienta para superar esta limitación. La FIV se ha descrito como un método eficaz para predecir la capacidad fecundante de espermatozoides caninos frescos, refrigerados o congelados-descongelados (Holst et al., 2000; Mastromonaco et al., 2002; De los reyes et al., 2006; Silva et al., 2006). Sin embargo, hasta donde conocemos, esta investigación es el primer reporte de la capacidad fertilizante mediante una FIV heteróloga usando ovocitos bovinos zona intactos y espermatozoides epididimarios caninos congelados o vitrificados y suplementados con L-*carnitina* como ha sido usado en otras especies domésticas (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000; Vasconcelos et al., 2016; Galarza et al., 2019). Esta investigación expuso

información específica sobre la unión, penetración, poliespermia y formación de pronúcleos de espermatozoides (24 h post FIV).

Los resultados mostraron una baja interacción entre espermatozoides caninos congelados-descongelados o vitrificados-calentado y suplementados o no con L-*carnitina* y ovocitos bovinos madurados *in vitro* en comparación con su contraparte control (FIV homóloga: espermatozoides bovinos congelados-descongelados y ovocitos de vaca). Esto puede deberse probablemente a la ventaja que tuvieron los espermatozoides bovinos y los medios elaborados para una FIV homóloga. No obstante, nosotros demostramos que los espermatozoides caninos congelados o vitrificados, con o sin L-*carnitina* tuvieron la capacidad de penetrar los ovocitos caninos, fertilizarlos y formar pronúcleos. De hecho, se evidenció ventajas en espermatozoides caninos congelados con L-*carnitina* en comparación con los vitrificados sin este aditivo. Asimismo, se pudo evidenciar una correlación entre las variables cinemáticas (ej. motilidades, velocidades y linealidad) en aquellos espermatozoides congelados o vitrificados con L-*carnitina*.

Esto indica que los espermatozoides epididimarios de perro fueron capaces de sufrir una reacción acrosómica y los ovocitos bovinos fueron capaces de reconocer espermatozoides caninos, lo que está de acuerdo con un estudio anterior que sugiere que el sistema lítico del acrosoma se conserva entre los mamíferos (Adham et al., 1996). Reportes anteriores desarrollados en otras especies indican que espermatozoides suplementados con L-*carnitina* mejoran la capacidad de unión de los espermatozoides a los ovocitos (Yang et al., 2020) así como la penetración (Longobardi et al., 2017).

5. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación concluyen que la suplementación de *L-carnitina* al diluyente de congelación o vitrificación produjo un efecto crioprotector en los espermatozoides epididimarios caninos debido a un mejoramiento de la integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosomal. Sin embargo, ni en la congelación ni en la vitrificación se observó el efecto potenciador de locomoción de la *L-carnitina* debido a que ninguna variable cinemática fue mejorada después del proceso de criopreservación.

Además, el proceso de congelación mostró ciertas ventajas sobre el proceso de vitrificación debido a los valores más altos de motilidad, velocidades, frecuencia de batida de flagelo y fertilidad después de una FIV heteróloga, independientemente de la adición o no de *L-carnitina* a los medios de criopreservación. No obstante, algunas variables cinéticas de progresividad se correlacionaron con la fertilidad *in vitro* lograda únicamente con los medios de congelación y vitrificación suplementados con *L-carnitina*.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso *L-carnitina* en los medios tanto de congelación como vitrificación, para criopreservar espermatozoides epididimarios (mantenidos en congelación hasta 96 horas). En consecuencia, la viabilidad y capacidad fertilizante encontrada mediante la adición de la *L-carnitina*, puede permitir en un futuro, ser considerado un antioxidante óptimo en distintas técnicas de reproducción asistida.
- Es recomendable valorar la fertilidad de los espermatozoides criopreservados con el uso de *L-carnitina* en condiciones *in vitro* o *in vivo*, mediante fecundación *in vitro* homóloga o inseminación artificial, respectivamente.
- Finalmente, se recomienda evaluar el efecto de la *L-carnitina* a distintas concentraciones, en semen criopreservado de perro, tanto eyaculado como epididimario, en investigaciones posteriores.

7. REFERENCIAS

- Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R., & Agarwal, A. (2009). L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and sterility*, 91(2), 589-596.
- Abdillah, D. A., Setyawan, E., Oh, H. J., Ra, K., Lee, S. H., Kim, M. J., & Lee, B. C. (2019). Iodixanol supplementation during sperm cryopreservation improves protamine level and reduces reactive oxygen species of canine sperm. *Journal of veterinary science*, 20(1), 79-86.
- Adham, I. M., Kremling, H., Nieter, S., Zimmermann, S., Hummel, M., Schroeter, U., & Engel, W. (1996). The structures of the bovine and porcine proacrosin genes and their conservation among mammals. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 377(4), 261-265.
- Agarwal, A., & Said, T. M. (2004). Carnitines and male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 8(4), 376-384.
- Agarwal, A., Virk, G., & Ong, C. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 32(1), 1-17.
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and development*, 16(5), 581-588.
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250(1-2), 66- 69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Aitken, R., Gibb, Z., Mitchell, L., Lambourne, S., Connaughton, H., & de Iuliis, G. (2012). Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod*, 87(5), 110.

- Aitken. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev.*
- Álamo, D., Batista, M., González, F., Rodríguez, N., Cruz, G., Cabrera, F. y Gracia. (2005). Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63, pp. 72-82.
- Aliabadi, E., Mehranjani, M. S., Borzoei, Z., Talaei-Khozani, T., Mirkhani, H., & Tabesh, H. (2012). Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iranian journal of reproductive medicine*, 10(2), 77.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 7(3), 145-173.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freez- ing: A review. *Cell and Tissue Banking*, 17(4), 745–756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
- Amiridis, G. S., Lymberopoulos, A., Varsakeli, S., Kouskoura, T., & Belibasaki, S. (2000). Ram seminal plasma and fertility: results from an ongoing field study. *Acta Veterinaria Hungarica*, 48(3), 335-341.
- Andrade, A. (2005). Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Memoria para optar al grado de doctor.
- Arduini, A., Denisova, N., Virmani, A., Avrova, N., Federici, G., & Arrigoni-Martelli, E. (1994). Evidence for the involvement of carnitine-dependent long-chain acyltransferases in neuronal triglyceride and phospholipid fatty acid turnover. *Journal of neurochemistry*, 62(4), 1530-1538.
- Armas, R., Fernández, S., Vásquez, V., Santiani, M., & Alexei, A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post

orquiectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3), 199-205. Recuperado el 4 de Enero de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172011000300004&script=sci_abstract

Ávalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. Ciudad de México: Universidad autónoma metropolitana, Obtenido de https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf

Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L. M., Grabow, M., Legred, J., & Ostwald, D. J. (2010). AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(4), 285–296. <https://doi.org/10.5326/0460285>

Badr, M., Ebtihal, A., Dohreig, R., Hussein, M., & Hassan, H. (2017). Effects of l-carnitine on morphology and antioxidant enzymes and dna integrity of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 63(152), 173-182.

Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R., & Bayachou, M. (2014). Cryoprotective effect of l-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia*, 46(6), 637-641.

Bansal, A., & Bilaspuri, G. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*. doi:10.4061/2011/686137.

Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón, F., & Sánchez, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermaática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico veterinario*, 8(1), 59-79. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/av/v8n1/2448-6132-av-8-01-00059.pdf>

- Berni, A., Meschini, R., Filippi, S., Palitti, F., De Amicis, A., & Chessa, L. (2008). L-carnitine enhances resistance to oxidative stress by reducing DNA damage in Ataxia telangiectasia cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 165-174.
- Betancur, G. R., Araque, N. V., & Garcia, E. A. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 119-129.
- Brahmkshtri, B., Edwin, M., John, M., Nainar, A., Krishnan, A. (1999). Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. *Anim Reprod Sci*; 54:159-168. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00108-0).
- Budai, C., Egerszegi, I., Olah, J., Javor, A., & Kovacs, A. (2014). The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen. *Animal Science and Biotechnologies*, 47(1), 46–52
- Budworth, P. R., Amann, R. P., & Chapman, P. L. (1988). Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology*, 9(1), 41-54.
- Bucak, S. Sariozkanb, P.B. Tuncera, F. Sakinc, A. Atessahin, R. Kulaksız, M. Cevik, The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities, *Small Rumin. Res.* 89 (2010) 24–30 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.015>.
- Caturla-Sánchez, E., Sánchez-Calabuig, M., Pérez-Gutiérrez, J., Cerdeira, J., Castaño, C., & y Santiago-Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, 80, 126-129. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.11.001

- Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., & Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 42(5), 479–488. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x>
- Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). *Animal andrology: theories and applications*. Wallingford, Oxfordshire, UK CABI.
- Chlopik, A., & Wysokinska. (Febrero de 2020). Canine spermatozoa-What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in domestic animals*, 55(2), 113-126. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/rda.13596>
- Concannon, P. W. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current veterinary therapy, small animal practice*, 1247-1259.
- Concannon, P., Whaley, S., Lein, D., & Wissler, R. (1983). Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *American journal of veterinary research*, 44(10), 1819-1821.
- Concannon, P. W. (1993). Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod. Fertil*, 47: 3-27.
- Condemayta, D. (2017). Criopreservación de espermatozoides colectados del epidídimo de carneros criollos y viabilidad In vitro. UNA-PUNO. Obtenido de <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/7718.4>
- Daena, R., F. Rigoni, G. Bonaga, I. Andrighetto, M. Bonsembiante and N. Siliprandi. (1984). Effect of carnitine on functions of bovine spermatozoa, pp. 258-261 In *Proc. 10th International Congress in Animal Reproduction and Artificial Insemination*. June 10-14, 1984, University of Illinois at Urbana-Champaign, U.S.A
- Dascanio, J. J. (2014). Computer-Assisted Sperm Analysis. *Equine Reproductive Procedures*, 368-372.

- Davis, R. O., & Siemers, R. J. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 857-869.
- Dawar, H., Ahmad, I., Muhammad, S., Fazal, W., Umer, F., Syed, A., & Amjad, R. (2018). Effect of osmotic pressure on spermatozoa characteristics of cryopreserved buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 274-277. doi:10.1080/09712119.2017.1295971.
- De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., & Woelders, H. (1991). The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of andrology*, 12(2), 112-118.
- De Leeuw, F., Chen, H., Colenbrander, B., & Verkleij, A. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27, 171-183.
- De Lima, J. S., de Freitas Guaitolini, C. R., Crespilho, A. M., Dell'Aqua, C. D. P. F., Martins, M. I. M., Rigoto, R. P. & Maziero, R. D. (2019). Efeito de meios diluidores na congelabilidade do semen canino/Effect of diluting media on canine semen freezability. *Brazilian Journal of Development*, 5(9), 15841-15855.
- De los Reyes, M., Carrion, R., & Barros, C. (2006). In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 66(6-7), 1682-1684.
- Souza, C. V., Brandão, F. Z., Santos, J., Alfradique, V., Santos, V., Morais, M., Rangel, P., Silva, A., & Souza-Fabjan, J. (2019). Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, 89, 104–108.
- Dokmeci, D. (2005). Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia medica*, 47(1), 26-30.

- Dorsten, C. M., & Cooper, D. M. (2004). Use of body condition scoring to manage body weight in dogs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 43(3), 34–37.
- Drobnis, E., Crowe, L., Berger, T., & Anchordoguy. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*, 265, 432-437.
- El-mamlouk, F., Noseir, W., & El-Amrawi. (2020). Improving Fertility of Male Dogs. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 64(2), 116-122. doi: 10.5455/ajvs.258462.
- England, G. C., & Allen, W. E. (1989). Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record*, 125(15), 399-399.
- El-Raey, Mohamed, MA, B., MM, A., & ZM, R. (2016). L-carnitine enhancing roles on Buffalo semen freezability, ultra-structure and fertilizing potentials. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 62(149), 163-173. DOI: 10.21608/avmj.2016.169979
- Farstad, W. (2009). Cryopreservation of Canine Semen - New Challenges. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2, 336–341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01418.x>
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 251-260. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01483-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01483-2).
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., Esmaeili, V., & Najafi, A. (2017). L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74, 148-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.009>
- Feldman, E., & Nelson, R. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction*. EEUU: Mc Graw Hill interamericana.

- Fraser, L., & Strzeżek, J. (2007). Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Animal reproduction science*, 99(3-4), 317-329.
- Galarza, D. A., de Guevara, M. L., Beltrán-Breña, P., Sánchez-Calabuig, M. J., Rizos, D., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019). Influence of sperm filtration and the addition of glycerol to UHT skimmed milk-and TEST-based extenders on the quality and fertilizing capacity of chilled ram sperm. *Theriogenology*, 133, 29-37.
- Galarza, D. A., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., ... & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15-21. (Galarza et al., 2021)
- Galarza, D. A., Lopez-Sebastian, A., & Santiago-Moreno, J. (2019a). Effectiveness of two-step accelerating cooling rate on post-thaw characteristics of ram sperm. In *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS* (Vol. 54, pp. 113-113). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019b). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, 91, 84-89.
- Galarza, D., López, A., & Moreno, J. (2020). Supplementing a skimmed milk–egg yolk-based extender with. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(7), 1-9. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/rda.13687>
- Gañán, N., González, R., Sestelo, A., Garde, J. J., Sánchez, I., Aguilar, J. M., ... & Roldan, E. R. S. (2009). Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology*, 72(3), 341-352.

- Gao, D., Ashworth, E., Watson, P., Kleinhans, F., & Mazur. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 49, 112-123.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Pérez-Guzmán, M. D., & Soler, A. J. (2009). Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71(4), 643-650.
- Garde, J., Aguado, M., Pérez, S., Garrido, D., Pérez-Guzmán, & Montoro, V. (1994). Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*, 41, 203.
- Gloria, A., Zambelli, D., Carluccio, A., Cunto, M., Ponzio, P., & Contri, A. (febrero de 2019). Gloria, A., Zambelli, D., Carluccio, A., Cunto, M., Ponzio, P., & Contri, A. (2019). Is the protective effect of egg yolk against osmotic and cryogenic damage on dog spermatozoa dose-dependent? *Animal Reproduction Science*, 230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106259>.
- González, J., Tadeo, J., Ortega, C., Toledano, Á., Vergara, M., & Ávalos, A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Rev. Salud Anim*, 35(2), 137-141. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n2/rsa10213.pdf>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on spermH post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th Ed. ed.). USA: Oxford University Press.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11(1), 73-88.

- Harshan, H., Singh, L., Arangasamy, A., Ansari, M., & Kumar, S. (2006). effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Anim. Reprod. Sc.*, 93, 124-133.
- Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., & England, G. C. W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1-2), 101-111.
- Holst, B. S., Larsson, B., Linde-Forsberg, C., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of reproduction and fertility*, 119(2), 201-206.
- Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. *Animal andrology: Theories and applications*, 76.
- Hufana-Duran, D., Duran, P. G., Monson, R., & Parrish, J. (2017). Motility and membrane integrity of ejaculated bovine spermatozoa extended and cryopreserved in L-carnitine Tris-egg yolk extender. *J ISSAAS*, 23, 56-67.
- Iguer-Ouada, M., & Verstegen, J. P. (2001). Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2), 671-684.
- Infante, J. P., Tschanz, C. L., Shaw, N., Michaud, A. L., Lawrence, P., & Brenna, J. T. (2002). Straight-chain acyl-CoA oxidase knockout mouse accumulates extremely long chain fatty acids from α -linolenic acid: evidence for runaway carousel-type enzyme kinetics in peroxisomal β -oxidation diseases. *Molecular genetics and metabolism*, 75(2), 108-119.
- Ivanova, M., Mollova, M., Ivanova-Kicheva, M. G., Petrov, M., Djarkova, T. S., & Somlev, B. (1999). Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*, 52(1), 163-170.

- Jeulin, C., & Lewin, L. M. (1996). Role of free L-carnitine and Acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(2), 87-102.
- Jeulin, C., Soufir, J. C., Marson, J., Paquignon, M., & Dacheux, J. L. (1987). The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the epididymis and epididymal spermatozoa of the boar. *Reproduction*, 79(2), 523-529. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0790523>
- Kawasaki, Y., Sakurai, D., Yoshihara, T., Tsuchida, M., Harakawa, S., & Suzuki, H. (2020). Effect of quercetin on the motility of cryopreserved canine spermatozoa. *Cryobiology*, 96, 50-54.
- Kim, E. J., Talha, N. A., Jeon, Y. B., & Yu, I. J. (2019). Effect of κ -carrageenan on sperm quality in cryopreservation of canine semen. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 34(1), 57-63.
- Kim, S., Yu, D., Kim, Y. (2010). Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim. Reprod. Sci.*, 119, pp. 106-114, 10.1016/j.anireprosci.2009.11.002
- Kjaestad, H., Ropstad, E., & Berg, K. A. (1993). Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34(3), 299-303.
- Kmenta, I., Strohmayer, C., Müller-Schlösser, F., & Schäfer-Somi, S. (2011). Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*, 75(6), 1095-1103.
- Kolster, K. A. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(4), 533-545.

- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, 425-435.
- Kumar, A., Prasad, J., Srivastava, N., & Ghosh, S. (2019). Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank*, 17(6), 603-612. doi:10.1089/bio.2019.0037.
- Kustritz, M., Olson, P., Johnston, S., Root, T. (1998). The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc* 34: 348-352.
- Lambrechts, H., Niekerk, F., Coetzer, F., Cloete, S., & Van der Horst, G. (1999). The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 1241-1249.
- Larsson, B., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal reproduction science*, 60, 327-336.
- Ledesma, A., Manes, J., Ríos, G., Aller, J., Cesari, A., Alberio, R., & Hozbor, F. (2015). Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(3), 386-392.
- Leibo, S. (1986). *Genetic Engineering of Animals*. New York.
- Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., & Donder, F. (1992). Metabolism and action of L-carnitine: its possible role in sperm tail function. *Arch Ital Urol Nefrol Androl*, 64(2), 187-196.
- Lenzi, A., Sgro, P., Paoli, D., Gilio, B., Lombardo, F., Santulli, M., . . . Gandini, L. (2004). A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with

- asthLucienozoospermia. Fertility and sterility, 81(6), 1578-1584. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.10.034.
- Linford, E., Glover, F. A., Bishop, C., & Stewart, D. L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Reproduction*, 47(2), 283-291.
- Longobardi, V., Salzano, A., Campanile, G., Marrone, R., Palumbo, F., Vitiello, M., Zullo, G. y Gasparini, B. (2017). Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 88, 236–243. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016
- Lucio, C., Ramos, D., Morales, M., & Infantosi. (2017). Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. *journal of veterinary andrology*, 2(1), 2542-3045.
- Lucio, C., Regazzi, F., Silva, L., Agrimani, D., Nichi, M., & Vannuchi, C. (2016). Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dog. *Theriogenology*, 85, 1568-1575.
- Luño, V., González, N., Martínez, F., González, B., Olaciregui, M., & Gil, L. (2020). Specific phosphodiesterase type-10 inhibitor, papaverine, added after the cooling period improves canine sperm quality. *Animal Biotechnology*, 1-7.
- Mastromonaco, G. F., Hay, M. A., & Goodrowe, K. L. (2002). The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology*, 57(3), 1123-1134
- Manee-in, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, T., Tharasanit, T., Chanapiwat, P., & Kaeoket, K. (2014). L-carnitine Supplemented Extender Improves Cryopreserved-thawed. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 27(6), 791-796. doi:http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13565
- Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (2018). Biochemical changes underlying the phenomenon of cold coldshock. *Arch Sci Biol*, 39(6), 578-588.

- Martínez, A. P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal reproduction science*, 82, 209-224.
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., Paz, P., & Anel, L. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65, 471-485.
- Martinez-Rodriguez, J. A., Carbajal, F. J., Martinez-De-Anda, R., Alcantar-Rodriguez, A., & Medrano, A. (2020). Melatonin added to freezing diluent improves canine (Bulldog) sperm cryosurvival. *Reproduction and Fertility*, 1(1), 11-19.
- Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A. (2006). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*. 66, pp. 2047-2055.
- Mazur, P., Leibo, S., & Chu, E. (1972). A two-factor hypothesis of freezing. *Exp. Cell Res*, 71, 345-355.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), C125-42. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of °cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14(3), 251-272.
- Medrano, A., Contreras, C., Herrera, F., & Rodriguez, A. (2017). Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(6), 241-246. doi:10.4103/2305-0500.217317.
- Mellisho, E., & Gallegos, A. (2010). Manual de laboratorio de reproducción animal. URL: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/reproduccionarchivos/practica>.
- Microptic. (2002). Microptic automatic diagnostic systems. Obtenido de Microptic automatic diagnostic systems: www.micropticsl.com

- Mingorance, C., Rodriguez-Rodriguez, R., Justo, M. L., Herrera, M. D., & de Sotomayor, M. A. (2011). Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine. *Nutrition reviews*, 69(5), 279-290.
- Mota, F., & Machado, L. (2012). Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 6(1), 1-8. Obtenido de <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2880/5074>.
- Olivo, I., Flores, J., Núñez, R., Val Arreola, D., & Toscano, I. (2017). Criopreservación de semen obtenido del epidídimo vs conducto deferente de bovinos post-mortem: resultados preliminares. *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal*, 10, 189-194.
- Páramo, R., & Balcázar, J. (2005). Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros. Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Park, S. H., Jeon, Y., & Yu, I. J. (2017). Effects of antioxidants supplement in porcine sperm freezing on in vitro fertilization and the glutathione and reactive oxygen species level of presumptive zygotes. *Journal of Embryo Transfer*, 32(4), 337-342.
- Peña, A., Barrio, M., Becerra, J., Quintela, L., & Herradón. (2012). Motile sperm subpopulations in frozen–thawed dog semen: Changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 133(3-4), 214-223. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.016>.
- Peña, A., Barrio, F., Quintela, L., Herradón, P. (1998). Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50, (1998), pp. 163-174, 10.1016/S0093-691X(98)00122-8
- Pontón Caamaño, A. P., & Lagos Recalde, J. P. (2014). Efectos de la refrigeración y crioconservación sobre la motilidad y mortalidad de espermatozoides caninos (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

- Pradieé, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., O'Brien, E., Estes, M. C., Beltrán-Breña, P., ... y Rizos, D. (2018). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 108, 314-320.
- Qamar, A. Y., Fang, X., Kim, M. J., & Cho, J. (2020). Improved viability and fertility of frozen-thawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
- Quintanilla, M. (2018). Efecto de los dilutores Tris, leche descremada sobre características espermáticas del semen refrigerado de canino. Repositorio institucional-UNAMBA-PERÚ.
- Ramsay, R. R., Gandour, R. D., & van der Leij, F. R. (2001). Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1), 21-43.
- Restrepo, G., Vasquez, N., & Garcia, E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4, 119–129.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., & de Kruif, A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64(3), 706-719.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & de Kruif, A. (2003). Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60(8), 1553-1568.
- Rota, A., Linde-Forsberg, C., Vannozzi, J., Romagnoli, S., Rodriguez-Martinez, H. (1998). Vitalität von Hundespermien nach Tiefgefrierung mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen und Gefrier- und Auftauraten *Reprod. Domest. Anim.*, 33 (1998), pp. 355-361, 10.1111/j.1439-0531. 1998.tb01370.x

- Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L., & Bame, J. H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal reproduction science*, 60, 663-677.
- Salinas, P., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2013). Criopreservación de Espermatozoides Caninos a-80C. *International Journal of Morphology*, 31(1), 217-224.
- Santiago-Moreno, J., & Galarza, A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18-38.
- Sánchez, Y., & Sánchez, J. (2015). Comparación de técnicas de colecta. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/90
- Sarica, S., Corduk, M., Suicmez, M., Cedden, F., Yildirim, M., & Kilinc, K. (2007). The effects of dietary L-carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(2), 178-186.
- Siemey, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci*, 169, 2-5.
- Silva, A. R., Rita de Cássia, S. C., Silva, L. D., Chirinéa, V. H., Lopes, M. D., & Souza, F. F. (2006). Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm–oocyte interactions. *Theriogenology*, 66(2), 456-462.
- Smith, J. F., & Murray, G. R. (1997). Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. In *Proceedings-new zealand society of animal production* (Vol. 57, pp. 246-250).
- Songsagen, n., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D., Eilts, B., Godke, R., & Leibo, S. (2002). Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*, 44(1), 79-90. doi:Cryobiology

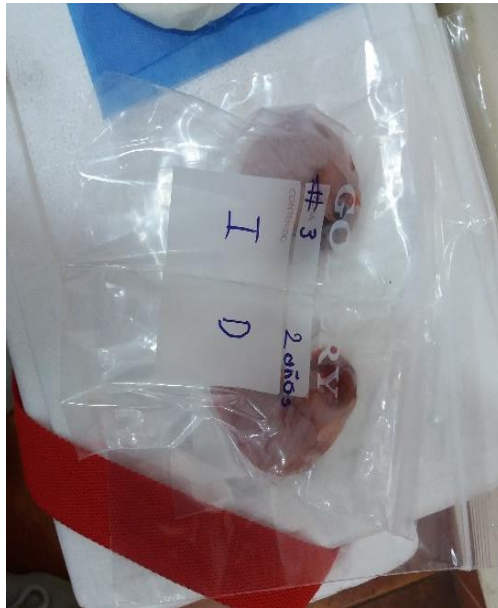
- Sztejn, J. (2013). Obtenido de <http://www.bioterios.com/2013/post.php?s=2013-05-01-criopreservacin-deesperma>.
- Thangasamy, T., Jeyakumar, P., Sittadjody, S., Joyee, A. G., & Chinnakannu, P. (2009). L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. *Biogerontology*, 10(2), 163-172.
- Threlfall. (2005). Manual de Reproducción del Perro y del gato. Barcelona: Multimédica ediciones veterinarias.
- Thuwanut, P., Chatdarong, K., Bergqvist, A. S., Söderquist, L., Thiangtum, K., Tongthainan, D., & Axné, E. (2011). The effects of antioxidants on semen traits and in vitro fertilizing ability of sperm from the flat-headed cat (*Prionailurus planiceps*). *Theriogenology*, 76(1), 115-125.
- Uchoa, D. C., Silva, T. F. P., Mota Filho, A. C., & Silva, L. D. M. (2012). Intravaginal Artificial Insemination in Bitches Using Frozen/Thawed Semen after Dilution in Powdered Coconut Water (ACP-106c). *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 289-292.
- Vaca Granda, M. D. (2016). Supervivencia y viabilidad espermática canina usando diluyentes de semen y concentraciones crio protectoras en toda la cadena de crio preservación de semen (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2016).
- Vasconcelos Franco, J. S., Faheem, M., Chaveiro, A., & da Silva, F. M. (2016). Effects of α -tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous in vitro fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*, 86(4), 957-962.
- Vieira, N., Losano, J., Angrimani, D., Kawai, G., Bicudo, L., Rui, B., & Nichi, M. (2018). Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology*, 108, 39-45. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.020>.

- Yáñez, I., Catalán, J., Rodríguez, J., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. doi: doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904
- Yang, K., Wang, N., Guo, HT, Wang, JR, Sun, HH, Sun, LZ, Yue, SL y Zhou, JB (2020). Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of boar semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 33 (11), 1763–1769. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0455>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146-156.
- Zakošek, M., Casal, M., Šterbenc, N., Klun, I., & Mrkun, J. (2020). Vitrification Using Soy Lecithin and Sucrose: A New Way to Store the Sperm for the Preservation of Canine Reproductive Function. *Animals*, 10(4), 653. doi:<https://doi.org/10.3390/ani10040653>.

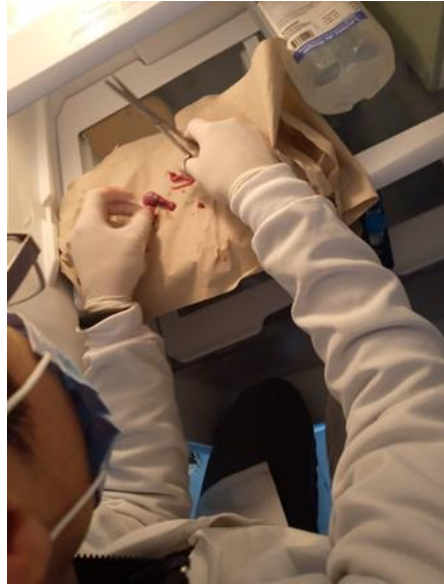
ANEXOS



Anexo 1. Orquiectomía en un perro mayor a un año de edad.



Anexo 2. Método de conservación de muestras con bolsas ziploc en un cooler previo al procesamiento.



Anexo 3. *Separación del epidídimo para facilitar la extracción de semen, a partir de estos.*



Anexo 4. *Canalización del conducto deferente para llevar a cabo el proceso del flujo retrógrado, para recuperación de semen.*



Anexo 5. *Conformación de los pools a partir de 3 muestras epididimarias óptimas.*



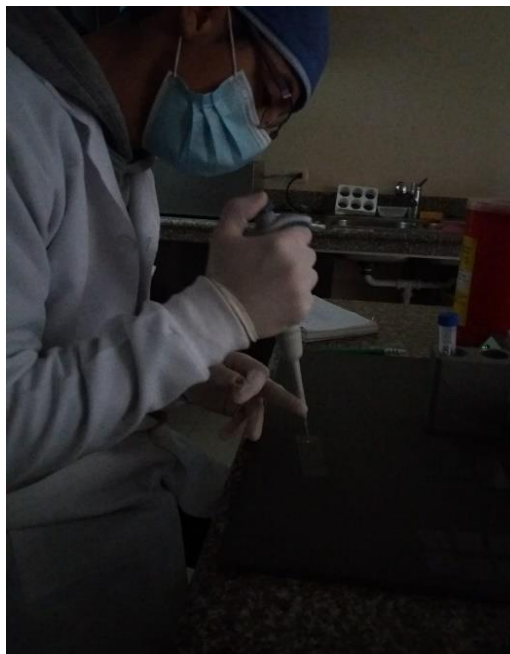
Anexo 6. *Esterilización de pajuelas previo a la congelación de semen.*



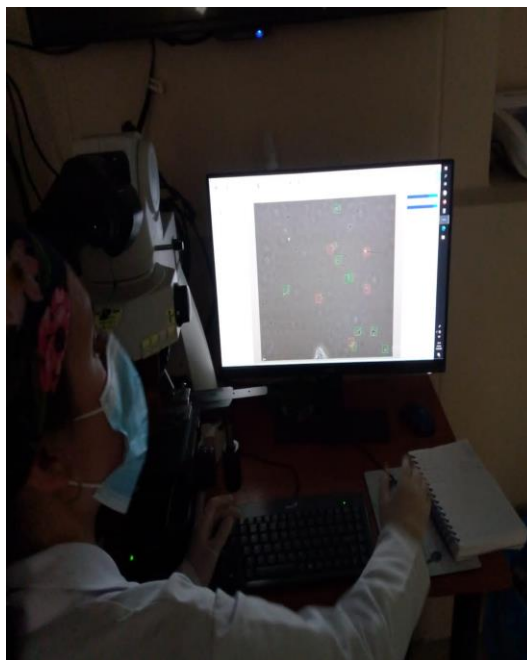
Anexo 7. Conformación de los pellets, con gotas de las muestras espermáticas (30 μ l) a 15 cm de altura.



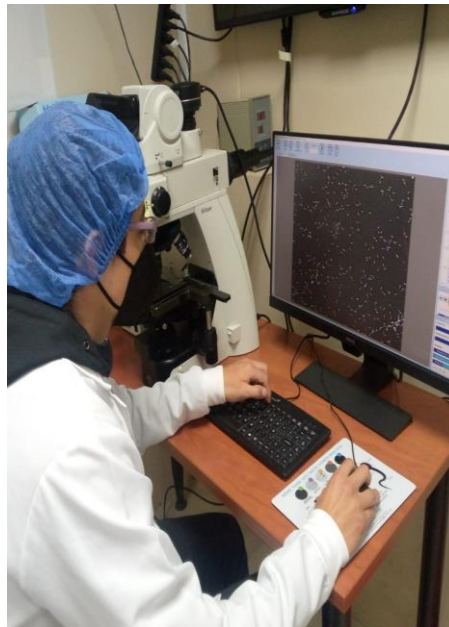
Anexo 8. Semen descongelado atemperándose en baño María previo al análisis de motilidad.



Anexo 95. *Adición de la mezcla de fluorescencia en la muestra espermática con hepes y con la luz apagada.*



Anexo 10. *Evaluación de las muestras teñidas, para definir la integridad de membranas espermáticas.*



Anexo 11. *Limpieza de campos de motilidad del sistema CASA.*



Anexo 12. *Aspiración folicular de ovarios del camal de Cuenca.*



Anexo 136. *Búsqueda y clasificación de ovocitos para colocarlos a madurar (MIV).*



Anexo 74. *Placas una vez realizadas el proceso de fijación, tinción y montaje para evaluar el resultado de la FIV a las 24 h.*