



## **Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

### **Efecto de la sacarosa, trehalosa y rafinosa en la vitrificación de espermatozoides equinos**

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

#### **Autores:**

Máximo Emiliano León Quinteros

Karen Mercedes Sacoto Patiño

#### **Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID: 0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2024-02-05

## Resumen

Esta investigación evaluó el efecto de diferentes agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP) en la vitrificación de espermatozoides equinos. Para ello, se usaron 16 eyaculados de cuatro caballos españoles, recogidos mediante vagina artificial. Cada eyaculado fue diluido con el diluyente Botusemen-Gold® + 1% BSA y dividido en 4 alícuotas para conformar cuatro tratamientos respectivamente, según la congelación o vitrificación con ACNP: congelación convencional (CC, control), y vitrificación con 100 mM sacarosa (VIT-Sa); con 100 mM trehalosa (VIT-Tre); y con 50 mM rafinosa (VIT-Raf). La CC se hizo en vapores de nitrógeno líquido ( $NL_2$ ), mientras que las vitrificaciones sumergiendo gotas de 30  $\mu l$  directamente en  $NL_2$ . Los resultados de las muestras espermáticas después de la descongelación y calentamiento demostraron que el tratamiento CC produjo una mayor ( $P<0,01$ ) motilidad, cinemática e integridad de membranas en comparación con todos los tratamientos de vitrificación. No obstante, los tres tratamientos de vitrificación presentaron mayores valores ( $P<0,05$ ) de velocidad rectilínea, linealidad y oscilación que el tratamiento CC post-descongelación. Por otro lado, los tratamientos VIT-Sa y VIT-Raf mostraron valores más altos ( $P<0,05$ ) de motilidad total y progresiva e integridad de membranas plasmática y acrosomal en comparación con el tratamiento VIT-Tre después del calentamiento. Finalmente, todos los tratamientos vitrificación y CC incrementaron ( $P<0,05$ ) el largo y área de la cabeza de los espermatozoides después del calentamiento y descongelación respectivamente, comparado con su referente en fresco. En conclusión, los resultados demostraron que a pesar de que la congelación convencional produjo una mayor criosupervivencia espermática, la vitrificación con sacarosa y rafinosa produjeron una mayor motilidad e integridad de membranas comparadas con la trehalosa, demostrando ser un método atractivo para criopreservar espermatozoides equinos.

**Palabras clave:** vitrificación, espermatozoides, caballo, motilidad, integridad



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

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

## Abstract

This research evaluated the effect of different non-penetrating cryoprotective agents (NCPAs) in the vitrification of equine spermatozoa. To achieve this, 16 ejaculates from four Spanish horses were collected using an artificial vagina. Each ejaculate was diluted with the Botusemen-Gold® diluent + 1% BSA and divided into four aliquots to form four respective treatments based on conventional freezing (CF, control) and vitrification with NCPAs: 100 mM sucrose (VIT -Su); 100 mM trehalose (VIT-Tr); and 50 mM raffinose (VIT-Raf). CF was performed using liquid nitrogen vapors ( $\text{LN}_2$ ), while vitrifications were carried out by submerging 30  $\mu\text{L}$  drops directly into  $\text{LN}_2$ . The results of sperm samples showed that the CF treatment produced higher ( $P < 0.01$ ) motility, kinematics, and membrane integrity compared to all vitrification treatments. However, all three vitrification treatments exhibited higher values ( $P < 0.05$ ) for straight-line velocity, linearity, and oscillation than the CF treatment. Furthermore, VIT-Su and VIT-Ra treatments showed higher values ( $P < 0.05$ ) for total and progressive motility, as well as plasma and acrosomal membrane integrity, compared to the VIT-Tr treatment. Finally, all vitrification and CF treatments increased ( $P < 0.05$ ) the length and area of sperm heads compared to their fresh counterparts. In conclusion, despite conventional freezing resulting in higher sperm cryosurvival, vitrification with sucrose and raffinose produced greater motility and membrane integrity compared to trehalose, making it an attractive method for cryopreserving equine spermatozoa.

**Keywords:** vitrification, sperm, horse, motility, integrity



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

**Índice de contenido**

Introducción .....	15
2. Objetivos.....	18
2.1 General.....	18
2.2 Específicos .....	18
3. Revisión de literatura .....	19
3.1 Obtención de espermatozoides equinos .....	19
3.1.1 Recolección y transporte del semen.....	19
3.1.2 Dilución y centrifugación del esperma fresco.....	19
3.2 Criopreservación.....	20
3.2.1 Congelación convencional.....	22
3.2.1.1 Sistema convencional de congelación en vapores de nitrógeno líquido .....	23
3.2.1.2 Sistema automatizado de congelación .....	23
3.2.2 Vitrificación.....	24
3.3 Agentes crioprotectores .....	25
3.3.1 Agentes crioprotectores penetrantes (ACP) .....	25
3.3.1.2 Dimetilformamida (DMF) .....	26
3.3.2 Agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP).....	27
3.3.2.1 Disacáridos .....	27
3.3.2.1.1 Sacarosa .....	27
3.3.2.1.2 Trehalosa.....	28
3.3.2.2 Trisacáridos.....	29
3.3.2.2.1 Rafinosa .....	30
3.4 Análisis Espermático Asistido por Computador (CASA-SCA®).....	30
3.4.1 Motilidad espermática.....	31
3.4.2 Morfología espermática .....	32
3.4.3 Concentración espermática .....	32
3.4.4 Integridad de membranas plasmática y membrana acrosomal .....	33
3.4.4.1 Evaluación seminal por técnicas fluorescentes .....	33
3.4.4.1.1 Microscopía de fluorescencia.....	34
3.5 Daños durante la criopreservación seminal .....	35
3.5.1 Estrés oxidativo .....	36

3.5.2	Estrés osmótico.....	36
3.5.3	Estrés térmico .....	37
3.5.4	Estrés mecánico.....	37
3.5.5	Apoptosis .....	37
4.	Materiales y métodos.....	38
4.1	Materiales .....	38
4.1.1	Materiales físicos.....	38
4.1.2	Materiales biológicos .....	39
4.1.3	Materiales químicos y reactivos.....	39
4.2	Métodos.....	40
4.2.1	Área geográfica de estudio.....	40
4.2.2	Diseño experimental.....	41
4.2.2.1	Recolección y transporte de semen.....	42
4.2.2.2	Procesamiento del semen y asignación de tratamientos .....	43
4.2.2.3	Congelación convencional.....	44
4.2.2.4	Vitrificación.....	44
4.2.2.5	Análisis de motilidad.....	45
4.2.2.6	Evaluación de la integridad de membranas.....	45
4.2.2.7	Evaluación de morfometría de la cabeza de los espermatozoides.....	46
4.3	Análisis estadístico .....	46
5.	Resultados.....	47
5.1	Cinemática.....	47
5.2	Integridad de las membranas plasmáticas .....	50
5.3	Morfometría de la cabeza de los espermatozoides .....	52
6.	Discusión .....	55
7.	Conclusiones .....	62
	Referencias.....	63
	Anexos.....	79

**Índice de figuras**

Figura 1. Estructura de la sacarosa.....	28
Figura 2. Estructura de la trehalosa .....	29
Figura 3. Estructura de la rafinosa .....	30
Figura 4. Yeguada el Carmen .....	40
Figura 5. Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal .....	41
Figura 6. Diseño experimental .....	42
Figura 7. Conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer.....	43
Figura 8. Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes .....	47
Figura 9. Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) con sus trayectorias progresivas rápidas (VCL-R y VSL-R) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes.....	48
Figura 10. Rectitud (%), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes .....	49
Figura 11. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes .....	49
Figura 12. Registro de cinemática de espermatozoides equinos frescos .....	50
Figura 13. Registro de la cinemática de espermatozoides equinos después del proceso de criopreservación, evaluados mediante el sistema computarizado CASA-SCA® .....	50
Figura 14. Registro de la integridad de membranas de espermatozoides equinos evaluados mediante la prueba de doble tinción fluorescente IP + PNA/FITC. ....	52
Figura 15. Comparación de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes .....	54

Figura 16. Registro de espermatozoides equinos teñidos con SpermBlue® evaluados mediante el módulo ASMA (*Automated Sperm Morphometry Analysis*) del sistema computarizado CASA-SCA® ..... 54

**Índice de tablas**

Tabla 1. Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia (prueba IP / PNA-FITC) de espermatozoides equinos congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes.....	51
Tabla 2. Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides equinos congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes .....	53

## Índice de acrónimos

- [(L-W) / (L+W),  $\mu\text{m}$ ]** = Elongación  
**(4 $\pi$ A/P<sub>2</sub>,  $\mu\text{m}$ )** = Rugosidad  
**(A,  $\mu\text{m}^2$ )** = Área  
**(L,  $\mu\text{m}$ )** = Largo  
**(L/W,  $\mu\text{m}$ )** = Elipticidad  
**(P,  $\mu\text{m}$ )** = Perímetro  
**(p/vol)** = Peso/volumen  
**(W,  $\mu\text{m}$ )** = Ancho  
**( $\pi$ LW/4A,  $\mu\text{m}$ )** = Regularidad  
 **$\mu\text{l}$**  = Microlitros  
 **$\mu\text{m}$**  = Micras  
**AC** = Agente crioprotector  
**ACNP** = Agente crioprotector no penetrante  
**ACP** = Agente crioprotector penetrante  
**ANOVA** = Análisis de varianza  
**BCF** = Frecuencia de batida de flagelo del espermatozoide  
**BSA** = Albumina sérica bovina  
**CASA-SCA®** = Análisis Espermático Asistido por Computador  
**DMF** = Dimetilformamida  
**DPDA** = Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado  
**DPIA** = Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto  
**FITC** = Isotiocianato de fluoresceína  
**GLY** = Glicerol  
**Hz** = Hertz  
**IP** = Yoduro de propidio  
**IPDA** = Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado  
**IPIA** = Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto  
**LIN** = Índice de linealidad  
**M** = Molar  
**MA** = Membrana acrosomal  
**ME** = Membrana espermática  
**ml** = Mililitro  
 **mM** = Milimolar  
**MP** = Membrana plasmática

**NL<sub>2</sub>** = Nitrógeno líquido

**Nm** = Longitud de onda

**PNA** = Aglutinina (*Arachis hypogaea*)

**PVOH**= Alcohol polivinílico

**ROS** = Especies reactivas de oxígeno

**Spz** = Espermatozoides

**STR** = Rectitud

**T1 CC** = Tratamiento 1 congelación convencional

**T2 Vit-Sa** = Tratamiento 2 vitrificación sacarosa

**T3 Vit-Tre** = Tratamiento 3 vitrificación trehalosa

**T4 Vit-Raf** = Tratamiento 4 vitrificación rafinosa

**VAP** = Velocidad media

**VCL** = Velocidad curvilínea

**VIT** = Vitrificación cinética

**vol** = Volumen

**VS** = Solución de vitrificación

**VSL** = Velocidad en línea recta

### **Agradecimientos**

Agradezco en primer lugar a Dios, porque ha sido mi guía espiritual a lo largo de mi vida, permitiéndome cumplir una de las metas más importantes y mantenerme enfocado en cada paso que doy.

A mis padres, Cesar León y Carmita Quinteros, quienes siempre con su amor, esfuerzo y sabiduría me han apoyado incondicionalmente, sin ustedes, esto no hubiese sido posible, a mis hermanos Junior, Cristian y Johana quienes de una u otra manera me han apoyado a lo largo de mi vida, a mis sobrinos, Matías, Camila y Chelsea, ellos son sin duda el regalo más grande que la vida me ha dado.

Al Dr. Diego Andrés Galarza, por confiar en nosotros, creer en nuestras capacidades, dirigir y apoyar desde el primer momento este arduo pero gratificante trabajo mismo que ha sido dirigido por uno de los mejores profesionales en esta área.

Al Dr. José Luis Pesántez y Dr. Francisco Larriva, por llevar a cabo la revisión de este trabajo, sin su conocimiento, compromiso y ayuda esto no sería posible.

A los técnicos docentes del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, Dr. Mauricio Dumas y Dr. Xavier Samaniego, quienes nos guiaron y apoyaron en la realización de este trabajo, aportando con su conocimiento y experiencia.

A mis amigos y compañeros, quienes estuvieron en los mejores y peores momentos, ustedes me impulsaron a ser una mejor persona. Es imposible nombrar a todos, pero los llevo eternamente en mi mente y alma, fueron años llenos de experiencias, aventuras y risas.

Gracias a todos, este trabajo es también de ustedes.

**Máximo E. León Quinteros.**

**Agradecimientos**

A mis padres Carmita y Oswaldo, mis queridos hermanos Jhonnathan y Jefferson y mis adorados sobrinos Jedaya y Jeremías. Quienes han sido mi pilar a lo largo de la carrera universitaria, quienes estuvieron en todo momento apoyándome incondicionalmente, gracias por creer en mí y brindarme su comprensión en todo momento.

De manera especial al Dr. Diego Andrés Galarza por su incondicional apoyo en la elaboración de esta investigación brindándonos su experiencia, conocimientos y paciencia. Sin su apoyo esto jamás habría sido posible. Su dedicación y ejemplo es algo que llevaremos siempre con nosotros.

A los miembros del tribunal Dr. Jorge Luis Pesáñez y Dr. Francisco Larriva por brindarnos su tiempo y consejos para mejorar este proyecto de investigación.

Al técnico docente del área de espermatología del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, Dr. Mauricio Dumas por su apoyo, paciencia, conocimiento, disponibilidad, consejos y guías que nos han permitido mejorar y culminar este trabajo. Cada una de sus enseñanzas las llevaremos con nosotros.

A mis profesores a lo largo de toda la carrera universitaria quienes me han guiado y orientado para crecer como profesional, gracias por cada una de sus enseñanzas.

Finalmente, a todas las personas que se vieron involucrados ya sea de manera directa e indirecta durante el tiempo de mi período académico.

Sin su apoyo, esta investigación no habría sido posible. ¡Gracias a todos!

**Karen Mercedes Sacoto P.**

## Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, de manera especial a mis padres Cesar y Carmita, por todo lo que he recibido de ellos de manera incondicional, a mi abuelito Manuel Quinteros, quien me ha brindado su apoyo para poder cumplir con mis estudios de manera responsable y centrada, a mis abuelitos que están en el cielo, Humberto León, María de Jesús Andrade y María Calle, gracias por todo los quiero y extraño, nunca olvidaré todo lo que han hecho por mí.

**Máximo E. León Quinteros.**

**Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mi madre amada, quien ha sido parte fundamental para alcanzar esta meta juntas. Mi madre, persona que admiro mucho quien siempre fue, es y será mi profesora de vida. Sus palabras y consejos me han permitido tomar las mejores decisiones. Gracias por darme la fortaleza para seguir adelante frente a todas las adversidades. Con mucho cariño para ti mami.

**Karen Mercedes Sacoto P.**

## Introducción

La criopreservación es un proceso que consiste en preservar a las células a temperaturas bajo cero manteniendo en estado latente su metabolismo y capacidades vitales (Vera & Javiera, 2018). Este procedimiento permite conservar los recursos de especies domésticas de alto mérito genético y de especies silvestres en peligro de extinción (Borate & Meshram, 2022). Los espermatozoides, obtenidos a través del eyaculado o mediante el lavado retrógrado de la cola del epidídimo, son inmersos en medios de congelación que contienen un ácido (p. ej., N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetano sulfónico, ácido cítrico o ácido ascórbico), una sal (p. ej., lactato de sodio), una fuente de azúcar (p. ej., glucosa o fructosa) y un agente crioprotector penetrante (p. ej., glicerol). Al disminuir la temperatura, las células experimentan diversos cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que son determinados por las velocidades de enfriamiento (Mazur et al., 1974). Es por ello, que la congelación convencional se hace mediante vapores de nitrógeno líquido estático, sin embargo, su respuesta criogénica ha permitido tener una criosupervivencia alrededor y por debajo del 50% en el caso de carneros (Maxwell et al., 1993), búfalos (Lessard et al., 2009) y equinos (Watson, 2000; Squires, 2013). Se ha observado que el semen de equinos posterior a los procesos de congelación reduce considerablemente la capacidad fecundante, esto se debe a que los parámetros para la selección de los reproductores en esta especie se basan en el rendimiento en diferentes disciplinas ecuestres más no, en la capacidad reproductiva (Clulow et al., 2007; Varner et al., 2015).

Entre los factores más importantes que determina la crioresistencia de los espermatozoides, se han definido: choque de frío, estrés osmótico y estrés oxidativo, que están mediados por las velocidades de enfriamiento. Este daño criogénico se traduce a lesiones celulares como daño a las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial, fragmentación de ADN, estrés oxidativo y, en resumen, una baja capacidad de fertilización (Galarza et al., 2023). La subpoblación espermática que sobrevive satisfactoriamente a la congelación reduce su vida útil y la capacidad fecundante (Watson, 1995). Sin embargo, existen algunas diferencias entre estos dos procesos, en los cuales el espermatozoide sufre daños en su integridad y funcionalidad. Es por ello, que se ha planteado métodos de criopreservación de espermatozoides de equino que permitan proteger mejor al espermatozoide. Una de las opciones que ha despertado interés en el mundo de la criobiología es la vitrificación cinética (VIT).

La vitrificación cinética (VIT) de espermatozoides es un método de criopreservación que se basa en el enfriamiento a velocidades ultrarrápidas ( $> 20.000^{\circ}\text{C/min}$ ) que les permiten a las muestras espermáticas (en bajos volúmenes) alcanzar un estado vítreo sin la formación de cristales de hielo intra ni extracelular. Para lograr el estado vítreo, la VIT incluye altas concentraciones de agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP) tales como los azúcares disacáridos y trisacáridos. La sacarosa, trehalosa (disacáridos), y la rafinosa (trisacárido) han sido usados previamente en la VIT de espermatozoides de diferentes especies de mamíferos, incluyendo al caballo (Consuegra et al., 2018, 2019). Estos azúcares proporcionan hipertonicidad a los diluyentes, evitando la deshidratación de las células antes de la congelación (Aisen et al., 2002; Aboagla & Terada, 2003).

A diferencia de la congelación usando vapores de nitrógeno líquido ( $\text{NL}_2$ ) estático, la VIT ha logrado resultados promisorios de motilidad, vitalidad, morfología e integridad de las membranas en espermatozoides humanos (Le et al., 2019). No obstante, a pesar de las ventajas detalladas en la VIT de espermatozoides equinos, aún existen efectos nocivos como la toxicidad producida por la alta concentración de ACNP al cual se exponen las células (Consuegra et al., 2019).

La sacarosa y trehalosa han sido usados en la vitrificación de espermatozoides humanos y equinos a concentraciones de 20, 50, 100 y 200 mM adicionadas al medio de VIT (Schulz et al., 2017; Hidalgo et al., 2018; Consuegra et al., 2019). También, el uso de un trisacárido como la rafinosa (compuesto por galactosa, glucosa y fructosa) se ha usado eficientemente como ACNP en la vitrificación de espermatozoides equinos a una concentración entre 50, 100 y 200 mM adicionado al medio de VIT. Un trabajo previo, demostró que las dosis de 100 mM de sacarosa, 100 mM de trehalosa y 50 mM de rafinosa produjo mejores resultados de cinemática en espermatozoides equinos vitrificados (Consuegra et al., 2019). Los efectos beneficiosos de estas azúcares en los diluyentes sobre la viabilidad post-calentamiento de los espermatozoides es que proporcionan un sustrato energético extra para algunas células. Además, estos azúcares mantienen la presión osmótica del diluyente (Leibo & Songsasen, 2002). Se ha demostrado que la trehalosa a 100 mM produce una mejor criosurvivencia basada en motilidad y cinemática en espermatozoides equinos (Consuegra et al., 2019), sin embargo, en la mayoría de los parámetros tanto la sacarosa como la rafinosa producen resultados similares.

Por todo lo mencionado anteriormente, esta investigación demostró el efecto de diferentes ACNP adicionados a un medio de vitrificación frente a la congelación convencional y su

respuesta a la criosupervivencia espermática. En donde se comparó la adición de rafinosa a una concentración de 50 mM frente a 100 mM de sacarosa y 100 mM de trehalosa en el medio de vitrificación. Se cree que la rafinosa podría tener un efecto igual o mejor que los otros disacáridos usados previamente en la VIT espermática, debido a que ejerce su papel de crioprotector al interactuar con lípidos y proteínas de la membrana plasmática, manteniéndolas estables y reduciendo la posibilidad de daño por la formación de cristales de hielo intracelulares (Storey et al., 1998; Agca et al., 2002).

**1. Objetivos****1.1 General**

- Evaluar el efecto de diferentes agentes crioprotectores no penetrantes en la vitrificación de espermatozoides equinos.

**1.2 Específicos**

- Valorar la cinemática e integridad de membranas de espermatozoides equinos vitrificados con sacarosa, trehalosa y rafinosa.
- Evaluar las dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides equinos antes y después de la vitrificación con sacarosa, trehalosa y rafinosa.

## **2. Revisión de literatura**

### **2.1 Obtención de espermatozoides equinos**

#### **2.1.1 Recolección y transporte del semen**

Para la recolección de semen equino se usa comúnmente una vagina artificial, la cual proporciona resultados más satisfactorios y permite la obtención de muestras espermáticas menos contaminadas (Warren et al., 1979; Rossdale, 1991). La vagina artificial es un dispositivo que simula las condiciones naturales del tracto reproductor de la yegua, en particular: temperatura, presión y lubricación, para así estimular al caballo durante la eyaculación (Alarcón et al., 2012). La temperatura al interior de la vagina debe oscilar entre 40 a 47°C, al final de la vagina se ubica el recipiente colector de semen, los más usados son los de plástico, los cuales deben tener una temperatura entre 36 a 38°C para evitar que los espermatozoides entren en un shock térmico, los eyaculados obtenidos no deben estar en contacto con la luz solar directa para salvaguardar a las células espermáticas (Estévez et al., 2009).

La recolección del semen puede ser exitosa dependiendo del líbido natural que caracteriza al semental, pero influirán factores como la genética del animal, el ambiente e incluso la conducta del mismo (Robinson & Sprayberry, 2012). Una vez terminado el proceso, el semen recolectado se debe llevar inmediatamente al laboratorio para su procesamiento, dilución y análisis (Rodríguez, 2009).

#### **2.1.2 Dilución y centrifugación del esperma fresco**

En los protocolos estándar de congelación de semen es necesario retirar la mayor parte de plasma seminal por centrifugación simple y resuspensión del pellet en el diluyente de congelación con el objetivo de obtener espermatozoides concentrados (Alvarenga et al., 2016). La dilución se hará en base a la concentración espermática, si es muy concentrada será de 2:1 ración (vol/vol) y como mínimo en ración de 1:1. El diluyente debe ser adicionado al semen a una temperatura de 37° C para evitar golpes de frío (Gonzales et al., 2015).

Los diluyentes espermáticos tienen por objetivo contribuir en la reducción de lesiones e inducir a una mayor deshidratación celular y así evitar la formación de cristales durante la congelación. Están compuestos por diferentes sustancias (crioprotectores, azúcares, antibióticos, electrolitos, entre otros), que cumplen las siguientes funciones: proveer nutrientes como fuente de energía, proteger a los espermatozoides de la bajada de temperatura, mantener un adecuado equilibrio del pH, presión osmótica y balance electrolítico e inhibir el crecimiento bacteriano de (Alvarenga et al., 2016). El diluyente idóneo para la

criopreservación de semen equino, es aquel que reduce el daño ocasionado por varios ciclos de congelación-descongelación y que aumentan la recuperación de espermatozoides móviles y viables (Betancur et al., 2016).

Considerando que los diluyentes comerciales Botusemen-Special® y Botusemen-Gold®, ambos de base no sintética (proteínas micelares de leche desnatada), con la inclusión de antioxidantes, colesterol y caseína, respectivamente, han demostrado ser eficaces en protocolos de criopreservación de espermatozoides equinos bajo condiciones de refrigeración (Gobato, 2020; Lago et al., 2020).

## 2.2 Criopreservación

La criopreservación de espermatozoides, es un procedimiento de suma importancia en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida, es utilizado en la inseminación artificial y la producción de embriones por metodologías *in vivo* e *in vitro* (Vera & Javiera, 2018). Además de ser crucial para la conservación de especies, recursos genéticos y la mejora de la eficiencia reproductiva (Borate & Meshram, 2022). Esta tecnología de conservación permite una máxima distribución y una adecuada disponibilidad de material germinal de especímenes de interés, facilitando el desarrollo de programas de mejoramiento genético para rasgos de valor comercial en la especie, a través de la selección o los cruces dirigidos (Vera & Javiera, 2018). Tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de células o tejidos congelados a bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C, para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y lograr mantenerlo en condiciones de vida suspendida por largos períodos de tiempo, condición denominada estado de latencia o quiescencia. A las temperaturas descritas, cualquier actividad biológica, incluyendo reacciones bioquímicas que van a producir muerte celular, quedan efectivamente detenidas (Samper & Morris, 1998). Esto ha permitido poder almacenar células germinales de mamíferos por períodos largos de tiempo, incluyendo post-mortem, a través del uso de tanques criogénicos con nitrógeno líquido o en otros ambientes bajo cero (Meyers, 2012).

En la criopreservación la célula espermática se enfrenta a una fase crítica, esta ocurre cuando las células seminales atraviesan temperaturas de -15°C a -60°C, lo que puede generar daños nocivos en las células, una vez se supera ese umbral de temperatura, los espermatozoides cesan su actividad metabólica y se tornan células durmientes. El espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al encontrarse en nitrógeno líquido -196°C, en este momento no hay paso de agua, ya que esta se encuentra en forma de cristales, esto genera una viscosidad

alta, la difusión es prácticamente nula y no hay energía térmica para que ocurra una reacción química (Caldevilla et al., 2020).

Los espermatozoides pueden ser conservados mediante dos métodos: congelación convencional y vitrificación. El método convencional es un procedimiento que implica un largo proceso de congelación frente a la vitrificación, el cual es un método rápido sin eliminación de agua, que emplea una “tasa de enfriamiento alta”, sin embargo, la contaminación por nitrógeno líquido ( $NL_2$ ) es mayor y el tamaño de la muestra espermática es más baja en comparación a la congelación convencional (Borate & Meshram, 2022).

El éxito de la criopreservación depende de muchos factores, incluidos las interacciones entre el crioprotector, tipo de diluyente, velocidad de enfriamiento, tasa de descongelación, empaque y la variación animal individual (Layek et al., 2016; Malo et al., 2019; Maziero et al., 2019). Para que la criopreservación se considere un éxito, el proceso debe permitir que el espermatozoide retenga su capacidad de fertilización al ser descongelado. Para lograr esto, debe conservar su capacidad de obtener energía a través del metabolismo, mantener la configuración e integridad de la membrana plasmática normal, retener su motilidad, conservar la integridad y funcionalidad de enzimas como la acrosina dentro del acrosoma, y así poder penetrar el ovocito (Layek et al., 2016).

El mayor riesgo para el mantenimiento de estas funciones se presenta por la formación de cristales de hielo y el movimiento resultante de agua hasta gradientes osmóticos durante el proceso de criopreservación (Dalal et al., 2018). Se ha propuesto que la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir a la crioconservación se correlaciona con su capacidad para soportar el estrés y las reorganizaciones de la membrana inducidas por la temperatura (Oldenhof et al., 2012). Se sabe que varias organelas de los espermatozoides se han visto afectadas debido a los efectos de la crioconservación. La respuesta al estrés mostrada por los espermatozoides como reacción a una caída de temperatura y el daño por choque frío se manifiesta como una disminución en el metabolismo celular, alteración de la permeabilidad de la membrana, pérdida de componentes intracelulares, pérdida irreversible de la motilidad del espermatozoide y un aumento en el número de espermatozoides muertos. Los cuales influyen de manera significativa en la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Córdova et al., 2004; Malo et al., 2019; Tiwari et al., 2021).

La criopreservación de esperma equino todavía constituye un desafío tecnológico debido a las bajas tasas de supervivencia celular obtenidas, esto es atribuible a la alteración de la fisiología normal y la viabilidad de los espermatozoides, que por la manipulación y procesamiento excesivos son sometidos a diferentes tipos de estrés y, en consecuencia, las

bajas tasas de fertilidad (Vera & Javiera, 2018). Sin embargo, el semen equino criopreservado ha adquirido gran importancia en las últimas décadas, debido a los beneficios que ofrece su utilización. Entre éstos se destacan la posibilidad de almacenar el material genético de reproductores sobresalientes, distribuirlo internacionalmente, controlar enfermedades venéreas y aumentar la eficiencia del sistema de cría al posibilitar la inseminación de múltiples yeguas con un solo eyaculado (Mesa & Henao, 2012). Por lo que, en la actualidad en el campo de la reproducción equina se buscan alternativas para optimizar las tasas de fertilidad, sobre todo en el área de la criopreservación, la cual sigue dando bajos valores de viabilidad seminal. Por tal motivo, es de importancia el aprendizaje de nuevas técnicas de manipulación y conservación espermática (Gutiérrez, 2014).

### 2.2.1 Congelación convencional

La congelación del semen equino no ha sido fácil, ya que el espermatozoide de caballo exhibe diferencias fisiológicas, bioquímicas y de transporte en el tracto reproductor femenino en comparación a otras especies (Fleming et al., 2018). Una de las principales razones para esto, radica en que la selección genética de sementales se ha basado más en las características morfológicas y habilidades deportivas más que en las productivas y reproductivas (Clulow et al., 2007). Además, se ha determinado que esta especie no se ajusta a los protocolos de programas de congelación espermática estandarizados para otras especies como el bovino, ya que se observan tasas insatisfactorias de calidad y fertilidad del semen descongelado (Blottner et al., 2001; Rocha, 2017).

Cuando se congela semen de manera rápida se genera una alteración conocida como (shock de congelación) y ocurre generalmente cuando se atraviesa por el intervalo de temperatura de 20°C a 1°C, lo cual se evidencia con los espermatozoides realizando movimientos circulares, a su vez se presenta una pérdida de motilidad prematura, merma la producción de energía, se desprende el acrosoma espermático, la permeabilidad de la membrana celular aumenta generando pérdida de iones y moléculas intracelulares, lo cual se atribuye a formación de cristales de hielo intracelulares (Wernli, 2010). A nivel mundial se llevan a cabo múltiples estudios enfocados a mejorar los procesos de congelación del semen equino y a encontrar sustancias que atenúen los daños producidos por el estrés oxidativo y el choque osmótico ocasionados por este proceso. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los caballos producen semen que se congela bien, el 60% congela de manera aceptable y el 20% se congela mal (De Oliveira et al., 2019).

Un factor muy importante para tener en cuenta en explicar la sensibilidad del espermatozoide equino a la congelación, es la diferencia entre la composición lipídica de las membranas

celulares espermáticas frente a otros mamíferos. Los espermatozoides de sementales y verracos tienen niveles mucho más altos de ácidos grasos docosapentaenoicos y menos colesterol en sus membranas respecto a especies como el bovino, estos lípidos del semen desempeñan un papel importante en las características del movimiento, la sensibilidad al choque frío y la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Macías et al., 2011).

#### **2.2.1.1 Sistema convencional de congelación en vapores de nitrógeno líquido**

La criopreservación con nitrógeno líquido hace uso de una curva de congelación en la cual las pajillas tienen un descenso gradual de la temperatura, para garantizar que los espermatozoides no mueran en el proceso, se inicia ubicando las pajillas de forma horizontal aproximadamente de 4 a 6 cm por encima del nivel del NL<sub>2</sub> durante 7 a 20 minutos, la congelación puede variar dependiendo de la altura a la que se coloca la pajilla, siendo generalmente rápida, posteriormente las pajillas se sumergen en el NL<sub>2</sub> donde pueden ser almacenadas por tiempo indeterminado, generando una viabilidad del 30-35% post-descongelación (Ávila et al., 2006). Este sistema presenta las ventajas de ser económico, sencillo y requerir un menor costo de equipamiento y de uso de nitrógeno líquido (Restrepo et al., 2012).

#### **2.2.1.2 Sistema automatizado de congelación**

Los sistemas automatizados de criopreservación usan curvas de congelación que combinan diferentes velocidades, sometiendo las pajillas a ciertas temperaturas bajo cero por minuto y así poder congelar el semen paulatinamente, posteriormente se sumergen las pajillas en NL<sub>2</sub>. La ventaja que ofrece este sistema es que las tasas de congelación son más uniformes, ya que se tiene control sobre la temperatura ofreciendo una mayor calidad post-descongelación respecto a la congelación con el sistema convencional, generando una viabilidad del 50% en espermatozoides equinos (Elgueta, 2018).

A pesar de que la congelación convencional es la técnica más usada para criopreservación de semen equino, se describen diversos inconvenientes asociados a la formación de cristales de hielo extra e intracelulares que conlleva cambios osmóticos, lo que ocasiona gran contracción celular y daños en el espermatozoide (Pérez et al., 2018). Las características y formas de los cristales de hielo dependen de las velocidades de enfriamiento (Mazur, 1984), las velocidades de enfriamiento más altas dan como resultado cristales más pequeños (Purdy, 2006), e incluso las velocidades de enfriamiento ultrarrápidas dan como resultado cristales extremadamente pequeños en comparación con los cristales de hielo de la congelación convencional (Bóveda et al., 2018).

Kumar et al. (2003) modificaron los protocolos de congelación de esperma de mamíferos (toro, carnero y verraco) respecto de sus procesos convencionales utilizando vapores de nitrógeno líquido mejorando sus velocidades de enfriamiento, desarrollaron una predicción teórica de las tasas de congelación óptimas y determinaron que usar velocidades de enfriamiento iniciales lentes antes y durante la nucleación del hielo, y luego acelerar a velocidades de enfriamiento altas de 60 a 140°C/min hasta -80°C/min, permitiría mejorar la criosupervivencia de los espermatozoides. Con base en esta predicción, se han llevado a cabo varias investigaciones utilizando la congelación convencional con velocidades de enfriamiento que incluyen aceleración, iniciando con velocidades de enfriamiento lentes seguidas de velocidades de enfriamiento más altas. Tanto en especies domésticas (caprino, carnero, perro, cobayo, toro y caballo) como silvestres (cabra montés ibérica y hurón), se han obtenido mejores resultados mediante protocolos de congelación con velocidades de enfriamiento por aceleración (incremento gradual) en comparación con aquellos protocolos de congelación con velocidades de enfriamiento iniciales altas seguidas de velocidades de enfriamiento desaceleradas (p.ej., las obtenidas con el método convencional en vapores de nitrógeno líquido). Por otra parte, estudios recientes sobre congelación lenta de espermatozoides de cobayos y perros han utilizado un sistema de congelación de dos rampas a dos alturas sobre el nitrógeno líquido, la criocaja modificada tiene dos rampas de congelación ubicadas a 7 y 17 cm o a 10 y 24 cm del NL<sub>2</sub>. El nivel de las rampas ha producido resultados deseables para la motilidad y la integridad de la membrana plasmática. Las dos rampas han generado tasas de enfriamiento inicialmente lentes y luego tasas más altas (a través de la aceleración) obteniendo mejores resultados (Galarza et al., 2023).

### 2.2.2 Vitrificación

La vitrificación es una técnica relativamente nueva, desarrollada como resultado de la búsqueda de alternativas a los métodos convencionales de criopreservación (Consuegra et al., 2021). Se trata de la solidificación de una solución utilizando altas concentraciones de crioprotectores no permeables (Azari et al., 2016), que ayudan a aumentar la viscosidad del medio y una disminución muy rápida de la temperatura a -196°C ( $2 \times 10^6 - 2 \times 10^7$  C°/min) (Phillips & Jahnke, 2016). Es considerada una técnica de congelación ultrarrápida que previene la formación de cristales de hielo (Squires, 2016), preservando así la arquitectura intracelular y de las membranas. El éxito de la vitrificación depende de tres factores claves: la velocidad de enfriamiento, la alta concentración de los crioprotectores añadidos a la solución de vitrificación (VS) comparado con las concentraciones que se usan en la congelación convencional (CC) y el volumen de la muestra (Xueli et al., 2015).

La vitrificación se basa en la inmersión directa de los espermatozoides en NL<sub>2</sub> (Consuegra et al., 2021), con el fin de aumentar las tasas de enfriamiento y calentamiento que son factores críticos para una vitrificación exitosa, lo que permite reducir las concentraciones de crioprotectores (Rusciano et al., 2017). Las velocidades de enfriamiento extremadamente altas aumentan la viscosidad de los fluidos intracelulares y extracelulares, lo que impide todo tipo de difusión molecular y se traduce en una disminución o incapacidad para formar hielo (Galarza et al., 2023). Se ha denominado vitrificación cinética debido a la bajada de temperatura ultrarrápida que promueve la solidificación vítreo del esperma (Pradiee et al., 2015).

### 2.3 Agentes crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles de bajo peso molecular, que tienen la capacidad de reducir el efecto eutéctico de la solución a la que se incorporan (Martínez et al., 2011). El punto eutéctico es la máxima temperatura a la que se puede producir la mayor cristalización de la solución. La reducción del mismo provoca una mayor deshidratación de los espermatozoides, generando un gradiente osmótico menor, lo que conlleva a que la célula quede protegida (Ramómez et al., 2017), promoviendo el alcance de una concentración de solutos a menor temperatura, en donde el grado de deshidratación celular es mayor y el gradiente osmótico al que se somete será menor. Es posible clasificar estos compuestos en penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la capacidad permeable de los mismos sobre la membrana celular, además se pueden diferenciar de acuerdo a su naturaleza bioquímica en 3 orígenes: alcoholes, azúcares y el dimetilsulfóxido (Martínez et al., 2011). Para alcanzar resultados óptimos tras la criopreservación, los espermatozoides deben ser protegidos mediante agentes crioprotectores (AC), describiéndose dos tipos básicos:

#### 2.3.1 Agentes crioprotectores penetrantes (ACP)

Son compuestos de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana plasmática, producen una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos de esta, lo cual hace que su fluidez incremente, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas (Ramómez et al., 2017). Los agentes crioprotectores penetrantes (ACP) más empleados son: (glicerol [GLY], dimetilsulfóxido [DMSO], dimetilacetamida [DMA], dimetilformamida [DMF], 1,2 propandiol, etilenglicol [ETG], propilenglicol, entre otros) (Pradiee et al., 2015). Todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando en ella y protegiendo el citoplasma (Cuevas et al., 2011), atraviesan la membrana espermática y protegen a la célula de las lesiones producidas por la congelación a velocidades lentas (Sandoval, 2005). Sin embargo, al ser usados en grandes cantidades estos resultan ser tóxicos para el espermatozoide

dependiendo del tipo, concentración, temperatura y tiempo de exposición (Cuevas et al., 2011).

### **2.3.1.1 Glicerol (GLY)**

Es el crioprotector más usado, pero no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos. Presenta un claro efecto negativo, pudiendo ser uno de los factores implicados en la baja motilidad y fertilidad post-descongelación que ha sido descrito en aves y en equinos (Ávila et al., 2006). Los primeros estudios informaron que el glicerol (GLY) reduce la calidad del semen fresco y congelado-descongelado en algunas especies (carnero y toro) (Watson & Martin, 1975). También se ha informado que es perjudicial cuando se añade a diluyentes a temperaturas superiores a 30°C, así como en concentraciones elevadas superiores ( $> 6\%$  o  $< 2\%$ ) (Colas, 1975). El GLY se utiliza generalmente en concentraciones de 0,5 a 1,5 molar (M) (aproximadamente 4 a 10% vol/vol) (Watson & Fuller, 2001).

El principal efecto tóxico del glicerol está desencadenado por el estrés osmótico activo, que cambia el contenido de agua de los espermatozoides producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Ávila et al., 2006), cualquier estrés osmótico inducido podría reducir la longevidad de los espermatozoides y acelerar su capacitación (Galarza et al., 2023). Por lo que se ha propuesto el uso de crioprotectores alternativos permeables de menor peso molecular y viscosidad y mayor permeabilidad, que desencadenen un menor estrés osmótico y una menor formación de cristales de hielo intracelulares (Ávila et al., 2006).

### **2.3.1.2 Dimetilformamida (DMF)**

La dimetilformamida es una sustancia con un peso molecular inferior al del glicerol, se utiliza como agente crioprotector y no se comporta como sustancia tóxica durante el proceso de criopreservación (Alvarenga et al., 2005). Favorece a disminuir el estrés osmótico que otros crioprotectores ocasionan en la célula espermática, es un crioprotector benéfico para espermatozoides equinos con baja tasa de supervivencia post-descongelamiento (Gomes et al., 2002). Debido a que las amidas son de naturaleza hidrofílica, su interacción con el agua reduce la formación de cristales de hielo dentro de la célula. De allí, el éxito de su uso como crioprotector para semen de varias especies, incluyendo perros, caballos, cerdos, conejos y aves (Alvarenga et al., 2005).

### 2.3.2 Agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP)

Son sustancias que presentan un alto peso molecular, son muy efectivos en la criopreservación a altas velocidades (vitrificación) y promueven la rápida deshidratación celular. Son compuestos que no atraviesan la membrana plasmática por su elevado peso molecular, generando el efecto protector en el medio extracelular, ya que favorecen un medio hipertónico que ocasiona que el agua salga de la célula (deshidratación), previniendo que se formen cristales de hielo intracelulares (Ávila et al., 2006). La adición del ACNP se realiza a diferentes temperaturas, dependiendo de la permeabilidad y citotoxicidad del mismo, estos se pueden añadir o extraer aumentando o disminuyendo gradualmente la concentración del crioprotector en el medio, lo que reduce considerablemente el estrés osmótico sobre la célula a congelar (Fernández et al., 2009).

Los crioprotectores no permeables a su vez se clasifican en crioprotectores de alto y bajo peso molecular. Los de alto peso molecular son: polímeros como el polivinil alcohol, polietilenglicol, ficoll y polivinil pirrolidona y los de bajo peso molecular son: monosacáridos, disacáridos como la sacarosa (el más empleado actualmente), trehalosa, glucosa y galactosa (Izquierdo et al., 2015) o trisacáridos como la rafinosa en altas concentraciones (100 a 500 mM), que pueden ser tóxicos para las células (Galarza et al., 2023).

#### 2.3.2.1 Disacáridos

Estos compuestos toman su nombre por estar constituidos por la unión de dos moléculas de monosacáridos, su fórmula general es  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , indicativo de que una molécula de agua es eliminada durante la combinación de los monosacáridos. Pertenecen al grupo de los hidratos de carbono y son solubles en agua (Maynard et al., 2012).

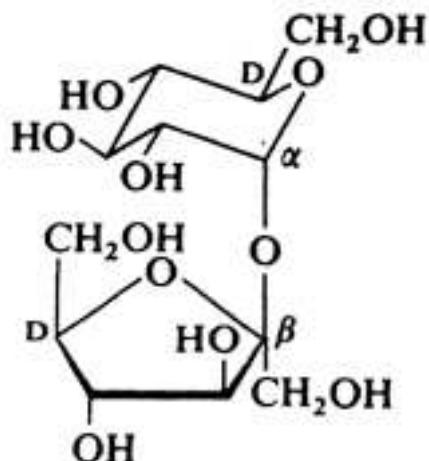
Un estudio realizado por De Leeuw et al. (1993) demostró que la adición de disacáridos como la sacarosa y trehalosa a los medios de congelación de semen de toro, puede producir ligeras mejoras en la supervivencia de los espermatozoides. Por otra parte, Woelders et al. (1997) determinaron que la adición de sacarosa y trehalosa contribuye en la protección del espermatozoide durante los procesos de criogenización dependiendo de la osmolaridad del medio.

##### 2.3.2.1.1 Sacarosa

También conocido como *O- $\alpha$ -D-glucopiranósil-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranósido* (McDonald et al., 2011), tiene un peso molecular de 342,30 g/mol. Este compuesto está presente en productos vegetales como la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Es una azúcar reductora debido

a que no posee grupos aldehídos o cetonas libres, durante el proceso de hidrólisis enzimática por la sacarasa o por acción de un ácido, se obtiene como resultado los dos monosacáridos que la integran (Maynard et al., 2012).

Esta azúcar ejerce su acción crioprotectora sobre la integridad de membrana y la estabilización de proteínas durante la deshidratación y rehidratación celular en el transcurso de la criopreservación y el calentamiento o descongelación (Leslie et al., 1995). Según un estudio por Aisen et al. (2000), en los diluyentes con ausencia de glicerol, los parámetros de motilidad post-descongelamiento en espermatozoides de carnero fueron mayores en presencia de sacarosa en comparación a aquellos a los que se adicionó glucosa, demostrando el efecto crioprotector de los disacáridos.



**Figura 1.** Estructura de la sacarosa, tomado de Allinger et al. (1984).

### 2.3.2.1.2 Trehalosa

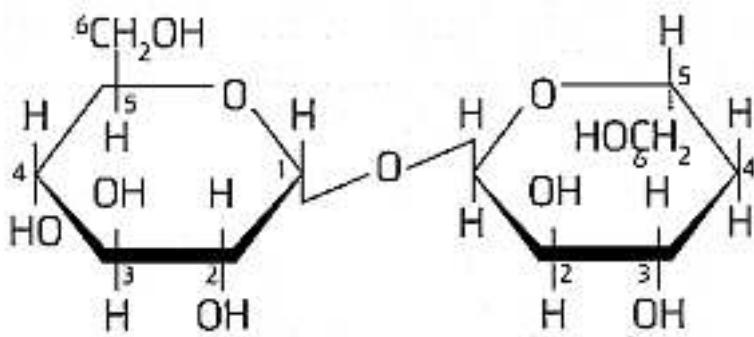
La trehalosa es un oligosacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa, llamada también *O α-D-glucopiranosil-(1à1)- α-D-glucopiranósido*, su peso molecular es igual al de la sacarosa 342,30 g/mol. Es un compuesto estable durante los procesos de calentamiento y en medios ácidos, ha sido aislada en más de 80 especies entre plantas, hongos, algas, levaduras, insectos y otros invertebrados (Ramos et al., 2009).

Según Rossi. (2012) existen varias investigaciones en bovinos y ovinos de la trehalosa como agente crioprotector que han demostrado resultados promisorios en la viabilidad espermática, en donde se ha evaluado parámetros como la motilidad en masa, motilidad individual progresiva y el % de espermatozoides vivos post-calentamiento. Además, el valor de la

trehalosa reside en que es un crioprotector no permeable, que mantiene la estructura de la membrana de los espermatozoides contra los efectos del estrés oxidativo y el shock térmico producido durante el descenso ultrarrápido de la temperatura (Hu et al., 2010).

La trehalosa actúa en conjunto con los lípidos de membrana, su acción crioprotectora posee un efecto estabilizador de la membrana, lo cual hace que dicha estructura tenga un impacto negativo frente a los cambios de temperatura. Al igual que otros azúcares, actúa a nivel extracelular manteniendo la presión osmótica y la integridad de membrana (Rossi, 2012).

Otros estudios determinan que el diluyente en adición a la trehalosa mejora la acción antioxidante y reduce el estrés oxidativo de los procesos de criopreservación. Por ello, la trehalosa favorece la deshidratación, reduciendo significativamente el efecto negativo del flujo de agua de la membrana, que ocurre durante la criopreservación y la formación de hielo intracelular (Yildiz et al., 2000).



**Figura 2.** Estructura de la trehalosa, tomado de Valenzuela. (2012).

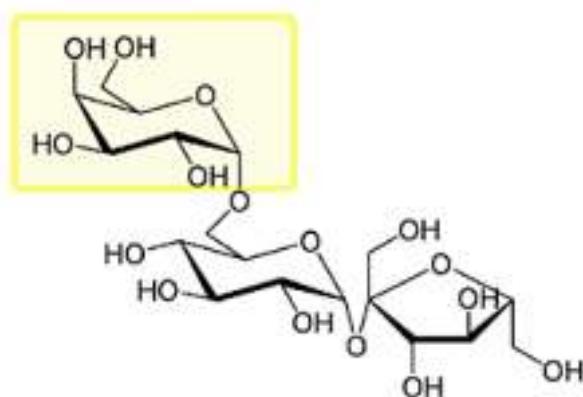
### 2.3.2.2 Trisacáridos

Existen muy pocos trisacáridos conocidos y básicamente están constituidos por la unión de tres moléculas de monosacáridos, su fórmula general es  $C_{18}H_{32}O_{16}$ , son muy semejantes a los disacáridos en su estructura, uno de los más comunes es la rafinosa (Beyer & Wolfgang, 1987). En los procesos de criopreservación se ha visto que estos compuestos tienen una mayor capacidad protectora frente a los daños ocasionados por la formación de cristales de hielo intra y extracelular y al estrés osmótico consecuente de los medios de criopreservación, protegiendo la membrana celular durante los procesos de enfriamiento y congelación (Suárez et al., 1991).

### 2.3.2.2.1 Rafinosa

Es el compuesto más abundante de los trisacáridos, su peso molecular es de 504,42 g/mol (McDonald et al., 2011). Es un derivado de los procesos industriales de la sacarosa, se puede encontrar en fuentes de origen vegetal y en pequeñas concentraciones en la remolacha azucarera, se estima que las semillas de algodón contienen aproximadamente 80 g de rafinosa por kg. Al final del proceso de hidrólisis se obtienen 3 moléculas de monosacáridos, glucosa, fructosa y galactosa. Esta azúcar como muchas otras juega un papel crioprotector al interactuar con los lípidos y proteínas de membrana, reduciendo considerablemente la posibilidad de daño celular grave por la formación de cristales de hielo intracelulares (Storey et al., 1998; Agca et al., 2002). Se ha documentado las propiedades crioprotectoras de diferentes azúcares contra los daños inducidos por la congelación y descongelación en varios tipos celulares (Yildiz et al., 2000; Agca et al., 2002; Bucak et al., 2007).

El efecto de la rafinosa se relaciona con el estrés oxidativo, en donde se involucra de manera indirecta la señalización y desencadenamiento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Van Den Ende & Valluru, 2009). Ha sido empleada en diferentes procesos de criopreservación de espermatozoides de roedores, en un estudio elaborado por Tada et al. (1990), se demostró que al adicionar 18% de rafinosa a un medio de criopreservación para ratones, mejora significativamente los parámetros de motilidad y la capacidad de fertilización, debido a la mayor protección contra el shock térmico que la rafinosa proporciona frente a la sacarosa, además determinó que el GLY y la DMF fueron menos eficientes.



**Figura 3.** Estructura de la rafinosa, tomado de Minen. (2021)

### 2.4 Análisis Espermático Asistido por Computador (CASA-SCA®)

El Análisis Espermático Asistido por Computador (CASA-SCA®, *Computer Assisted Sperm Analysis*) evalúa con mayor seguridad y objetividad las características de movilidad individual

de los espermatozoides (Varner, 2008). Además, la habilidad de analizar la morfología y concentración espermática (Dascanio, 2014). Este sistema computarizado basa su análisis en la captura y digitalización de imágenes sucesivas con una cámara montada en un microscopio de contraste de fase del movimiento de cada espermatozoide, para interpretarse mediante un software y reflejarse en una serie de parámetros calculados matemáticamente (Varner, 2008).

#### 2.4.1 Motilidad espermática

La motilidad espermática es una de las pruebas comúnmente empleadas para evaluar la calidad de una muestra seminal, permitiendo diferenciar entre muestras de baja y alta calidad (Puga et al., 2018). La evaluación del porcentaje de la capacidad de movimiento espermático, debe tener movimientos progresivos, esto da información de la calidad de la integridad morfológica de los espermatozoides y de la membrana espermática (Veloz, 2017). El sistema CASA-SCA® obtiene la evaluación a través de algoritmos basada en el movimiento de la cabeza del espermatozoide y su dimensión, además pueden realizar un análisis de movimiento a través de videocámaras, adaptadas al microscopio capturando diferentes cuadros en los cuales se determinan las características del movimiento espermático incluyendo: motilidad total (MT, %) y progresiva (%), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), linealidad (LIN), rectitud (STR), oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), y frecuencia de batida del flagelo (BCF) (Ley et al., 2002; Baumber, 2011). Las velocidades espermáticas, principalmente velocidad curvilínea (VCL) y velocidad en línea recta (VSL) son las dos características cinemáticas relacionadas con el potencial de fertilidad. (VCL) es una herramienta que permite la identificación de la reserva de espermatozoides en la unión útero-tubal en ratones, mientras que los espermatozoides que presentan altos valores de (VSL) tienen un alto potencial de fertilidad en humanos, en equinos aún no hay estudios que demuestren una correlación directa, pero se cree que el obtener valores altos (VCL y VSL) puede estar relacionado con un alto potencial de fertilidad (López et al., 2007).

Al momento de la evaluación se debe proveer al esperma un medio controlado que no cause cambios drásticos a su normal funcionamiento y por ende nos den resultados equivocados. Para proceder con la visualización del semen, se debe utilizar microscopía adecuada de contraste 20X y 40X aumentos, el aumento final debe ser de 200X y 400X respectivamente, el microscopio usado debe tener una temperatura ajustada a 37°C (Love, 2016). Un semental se considera apto para congelación al tener valores de motilidad progresiva entre el 60-70 % en semen fresco y 30-35% en semen post-descongelación. Con la observación de la motilidad

se evalúa la viabilidad del esperma en busca de la existencia de anomalías morfológicas y la concentración de espermatozoides en la muestra observada (Benjumeda & Gómez, 2017).

#### **2.4.2 Morfología espermática**

Se define a la forma anatómica del espermatozoide y consiste en uno de los principales factores a evaluar en una muestra seminal (Veloz, 2017). La morfología puede ser analizada diluyendo una alícuota de semen en una solución fijadora y examinando la muestra entre un porta y cubreobjetos en el microscopio de contraste de fases (Garner et al., 1986). Se evalúa si los espermatozoides presentan alteraciones morfológicas, para lo cual se usan sustancias buffer en formol o por tinción. Se clasifican las anomalías morfológicas en: primarias, que se asocian con defectos en la espermatogénesis de origen testicular; secundarias, que se asocian a conductos extra testiculares y terciarias, que se desarrollan *in vitro*, como consecuencia de una colecta errónea o un manejo del semen inapropiado (Gonzales et al., 2015).

En el 50% de los casos en equinos, la inserción de la cola es abaxial y no es de forma central como en la mayoría de las especies; por ende, el patrón de motilidad progresiva no es rectilíneo (Ortega, 2001). En promedio un semental debe de tener un 50% de espermatozoides morfológicamente normales, aunque puede variar considerablemente durante la temporada reproductiva y en las evaluaciones rutinarias. La evaluación de la morfología de los espermatozoides nos indica las distintas anomalías de cabezas y piezas intermedias, acrosomas anormales, presencia de gotitas proximal y distal, cabezas desprendidas, piezas intermedias, colas dobladas, colas en espiral y células germinales prematuras. Se considera un eyaculado de baja calidad cuando son encontrados porcentajes superiores al 30% de defectos en la cabeza, 25% de gotas citoplasmáticas proximales o 40% de espermatozoides anormales (Brito, 2007). En consideraciones generales el material espermático no debe tener más del 30% de anomalías en la totalidad del eyaculado (Veloz, 2017).

#### **2.4.3 Concentración espermática**

Esta se determina a través de espermatozoides por unidad de volumen. Se puede medir la concentración por medio de recuento en la cámara de Neubauer o por espectrofotómetro. El cálculo de la concentración espermática es importante, ya que permite determinar la dosis inseminante correcta, o calcular el volumen de las muestras para los diferentes ensayos (Dutra et al., 2013). Los valores de la concentración espermática media en equinos fluctúan entre los 150 y 300 millones/ml (Hafez, 2000), con un rango de variación muy amplio de 30 -

800 millones/ml. El número total de espermatozoides dependerá básicamente de tres factores: el mismo semental, la estación del año y la frecuencia de eyaculado (Warren et al., 1979).

#### **2.4.4 Integridad de membranas plasmática y membrana acrosomal**

La membrana espermática (ME) es una estructura heterogénea y dinámica que presenta cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola. Participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hammerstedt et al., 1990). El proceso de congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de los dominios de estas membranas, produciéndose un efecto deletéreo que menoscaba los resultados de la valoración de motilidad, vitalidad y viabilidad espermática post-descongelación (Pérez et al., 2001; Vera, 2001; Madrid, 2004; Rubio, 2006; Rubio et al., 2007). De aquí deriva que la evaluación morfológica o estructural del espermatozoide haga énfasis en la valoración de la integridad de su membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA), por su rol preponderante como límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células tanto en términos de integridad morfológica, como funcional (Alvarenga et al., 2005).

En el análisis de las células espermáticas, algunas de las técnicas que han sido desarrolladas subestiman la capacidad fecundante, lo que hace necesario la implementación y el uso de tecnologías de análisis seminal, además de tener en cuenta los factores extrínsecos e intrínsecos a los cuales se somete el espermatozoide, lo que influencia en el proceso de la fecundación por el uso de semen de garañón o padrote. Es así, como las técnicas y métodos son la manera más segura, entre algunas de ellas se encuentran las microscopías fluorescentes, que permiten identificar las membranas con integridad conservada (Restrepo et al., 2013; Reyes et al., 2022).

##### **2.4.4.1 Evaluación seminal por técnicas fluorescentes**

El descubrimiento de una variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes, ha permitido un análisis más amplio de los atributos de los espermatozoides (Gillan et al., 2005). La evaluación del semen equino por técnicas fluorescentes puede valerse de diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares. Las principales técnicas utilizadas son la microscopía de epifluorescencia, la fluorimetría y la citometría de flujo (Restrepo et al., 2013).

#### 2.4.4.1.1 Microscopía de fluorescencia

Para los estudios de ácidos nucleicos, los fluorocromos más empleados son el yoduro de propidio (IP) (Parra, 1997). El IP es una tinción nuclear y por lo mismo sirve como tinción espermática de contraste (Cox et al., 1998), se trata de una tinción no permeable, esta no difunde al interior de la membrana plasmática cuando está intacta (Varner, 2008). Emite una fluorescencia roja cuando se asocia a los ácidos nucleicos del espermatozoide con la membrana celular dañada (Bollwein et al., 2008), solo tiñe los núcleos de los espermatozoides muertos (Restrepo et al., 2013), como consecuencia de la unión a la doble hélice nuclear (Parra, 1997). Recientemente se ha incorporado la utilización de lectinas asociadas a fluoresceínas como marcadores de acrosoma y de modificaciones plasmáticas en espermios eyaculados. Las lectinas son glicoproteínas que se unen específicamente a terminales azúcares ubicados en las estructuras celulares y por lo mismo, se han utilizado como marcadores específicos de glicoconjungados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal. Las lectinas permiten localizar cambios en la distribución de los azúcares sobre la membrana de los espermatozoides (Schwarz & Koehler, 1979). Para microscopía de fluorescencia se utilizan fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con lectinas, que tienen afinidad por el acrosoma, donde PNA-FITC se une a los terminales  $\beta$ -galactosa que se encuentran dentro de la membrana acrosomal externa (Hernández et al., 2012; Silva & Gadella, 2006). En donde se une al contenido acrosomal de los espermatozoides de la especie humana y equina, luego de la permeabilización de la membrana plasmática, determinando así la presencia o ausencia de la matriz acrosomal. Con esta técnica se pueden identificar claramente dos patrones: el primero corresponde a los acrosomas que fluorescen completamente de color verde, indicando un acrosoma intacto; y el segundo como solo una banda fluorescente en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, indicando la ocurrencia de la reacción acrosómica (Ramalho et al., 2007). Al haber daño en la membrana acrosomal, las lectinas pueden unirse a su zona de anclaje, reflejándose como fluorescencia de color verde (Ugarelli et al., 2017), clasificándolos en intactos y reaccionados, aquellos que se tiñen de verde fluorescente tienen el acrosoma intacto (ACI) y como (ACR) acrosoma reaccionado cuando el verde fluorescente no está presente en la región de la cabeza, o cuando está presente en la región ecuatorial de la cabeza (Hernández et al., 2017).

Se pueden usar combinaciones de tinciones para incrementar la información obtenida, como por ejemplo la combinación de yoduro de propidio (IP) + PNA/FITC la cual brinda información de la membrana plasmática más el estado del acrosoma (Graham & Mocé, 2005), esta

permite la evaluación del porcentaje de células que han perdido sus acrosomas pero que mantienen intacta la membrana sobre el núcleo, o sea, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica “verdadera” (Berger, 1990). Ambos fluorocromos actúan mediante la penetración de la membrana espermática y evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide, marcando las células viables. La asociación IP - PNA/FITC permite la detección de 4 subcategorías de células: I) viable, acrosoma intacto; II) viable, reacción acrosómica “verdadera”; III) muerto, acrosoma intacto; IV) muerto, reacción acrosómica “falsa” o por degeneración celular (Centola et al., 1990).

## 2.5 Daños durante la criopreservación seminal

Durante los procesos de criopreservación se producen daños letales y subletales en los espermatozoides similares a la apoptosis que afectan a la viabilidad e integridad de los espermatozoides y por lo tanto a su vida media y capacidad fecundante (Alvarenga et al., 2005). El daño producido sobre los espermatozoides durante un proceso de criopreservación (congelación o vitrificación), se han asociado a la formación de cristales de hielo intracelulares (Morris et al., 2012), este efecto es producido principalmente por el cambio en la osmolaridad, lo cual desencadena la pérdida de agua por parte del espermatozoide hacia un medio extracelular hiperosmótico, con la finalidad de equilibrar el medio intra y extracelular. Durante el proceso de descongelación o calentamiento, la célula es expuesta a una solución hipotónica en el medio extracelular, lo cual por difusión pasiva permite el ingreso de agua hacia el medio intracelular, incrementando el volumen espermático, dicho estrés al cual es sometido el espermatozoide puede causar daños irreversibles a la membrana celular (Pommer et al., 2002; Scherzer et al., 2009).

En este daño celular los espermatozoides son sometidos a estrés térmico, mecánico, osmótico y oxidativo. También durante la criopreservación se produce la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), las mismas no sólo son nocivas para la supervivencia celular; sino que también inducen, junto a otros factores a la criocapacitación. Así, en el transcurso del proceso de criopreservación se produce una pérdida de la movilidad y viabilidad de los espermatozoides, asociada a alteraciones en la composición y permeabilidad de la membrana plasmática, acrosomal y daño mitocondrial. Todos estos eventos reducen la supervivencia del espermatozoide y su capacidad para interactuar con el tracto reproductivo femenino registrándose bajas tasas de preñez. Es por ello que en la criopreservación se utilizan distintos protocolos de congelación, diluyentes y agentes crioprotectores, que tienen como propósito proteger a los espermatozoides de los posibles daños y evitar o reducir la criocapacitación (De Oliveira et al., 2019).

### 2.5.1 Estrés oxidativo

Durante el metabolismo oxidativo fisiológico de las células espermáticas se producen ROS, que desempeñan un papel importante en la funcionalidad espermática de capacitación, reacción acrosómica y el mantenimiento de la capacidad fecundante, entre otros. El problema se desencadena cuando se produce un desequilibrio en la producción o degradación de estas sustancias, desencadenando efectos adversos sobre los espermatozoides que afectan a la membrana plasmática, el ADN o parámetros espermáticos como la motilidad (Gutiérrez, 2014). Además, producen muerte celular o daños subletales que disminuyen la vida media espermática y capacidad de fecundación. Los espermatozoides equinos dañados o anormales, que forman parte de la población heterogénea tras la descongelación generan mayor cantidad de ROS que los vivos o normales, afectando negativamente a estos (Tortolero et al., 2005).

### 2.5.2 Estrés osmótico

Al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero cuando se somete a temperaturas entre los (0°C y los -20°C o hasta los -60°C) el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves. Los cristales de agua pura se comienzan a formar al bajar de -5°C, y por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos quedan separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela. Este fenómeno lleva a un aumento en la presión osmótica, y al ser el agua dentro del espermatozoide más lenta en formar cristales que el agua fuera de este, ocurre una salida de agua al medio extracelular por gradiente osmótica a través de la membrana plasmática. Como resultado de esto el espermatozoide se deshidrata (Fernández et al., 2009).

El estrés osmótico se ha asociado con efectos adversos sobre la motilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de las células espermáticas equinas, que podrían estar asociadas con el estrés oxidativo y es producido como resultado del incremento de los niveles de ROS a causa del choque térmico, la naturaleza química de los crioprotectores utilizados, de la alteración de la disponibilidad y la funcionalidad de los antioxidantes endógenos a causa de la remoción del plasma seminal y de la alteración estructural de los antioxidantes a causa de los efectos térmicos y tóxicos del proceso (Elgueta, 2018). Existe un rango de tolerancia osmótica espermática que en el equino está entre los 450 y los 1500 mOsm/Kg (Gutiérrez, 2014).

### **2.5.3 Estrés térmico**

Durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides que afectan a su viabilidad, debido a los cambios bruscos de temperatura, afectándose principalmente la membrana plasmática y acrosomal (Aretio, 2006), desencadenando una pérdida de integridad, funcionalidad y fluido, provocando alteraciones en la distribución y función de las proteínas de membrana, como consecuencia se altera la viabilidad espermática (Gutiérrez, 2014). El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura, sino también de la velocidad con que esta ocurra. Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Aretio, 2006).

### **2.5.4 Estrés mecánico**

Los daños en las estructuras celulares del espermatozoide ayudan a explicar el descenso de la movilidad y por ende de la fertilidad. Se ha reportado que los daños en la mitocondria están asociados a la disminución de la movilidad, pero también se ha encontrado que el semen con alto grado de daños a nivel del ADN nuclear registra una marcada disminución de la movilidad y velocidad espermática post-descongelación. La viabilidad de las células, definida como las células con membrana plasmática intacta y función mitocondrial, han sido seleccionados como indicadores para la evaluación de la calidad espermática, especialmente para la crioconservación del esperma, cuya membrana plasmática y mitocondrial pueden ser dañadas durante el proceso de crioconservación (Alvarenga et al., 2005).

### **2.5.5 Apoptosis**

Es un proceso de muerte celular programado desencadenado a través de la vía extrínseca, iniciado por los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral o la vía intrínseca activada en células con alteraciones en la homeostasis debido al estrés térmico, hipoxia o radicales libres, o también como mecanismo fisiológico para eliminar los espermatozoides del tracto reproductor de la hembra. Los procesos de congelación y descongelación inducen a fenómenos similares a la apoptosis (Gutiérrez, 2014).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Materiales físicos

- Vagina artificial (VA) Hannover para equinos (Ref: 11220/0145, Minitube®, Alemania)
- Manga interior (goma) para vagina artificial (VA) Hannover (Ref: 11222/0003, Minitube®, Alemania)
- Botella colectora de semen para VA equina (Ref: 11231/0200, Minitube®, Alemania)
- Parafilm®M (Ref: P7793, Sigma-Aldrich)
- Lubricante K-Y Gel® (Ref: SKU 100021489, REBE)
- Liners colectores
- Termómetro
- Caja de polietileno
- Papel aluminio
- Guantes de inspección
- Balanza electrónica de precisión (Ref: 00101)
- Microcentrífuga (PLC-01)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cámara de Neubauer (Ref: 81001MF)
- Caja criogénica de 2 rampas (24 y 10 cm de altura)
- Esterilizador UV (SKU:AE10187)
- Pajuelas de 0,5 ml (IMV, L'Aigle Cedex, Francia)
- Criotubos de 2 ml (NEST SCI.)
- Refrigeradora
- Tanque de nitrógeno líquido
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Baño María
- Placa térmica (Ref: 12055/0010, Minitube®, Alemania)
- Vasos de precipitación de 10 ml
- Dispositivo de calentamiento (STC-3008)
- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Sistema CASA-SCA®, (*Sperm Class Analyzer*, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0.9, software. Microptic S.L., Barcelona, España)

### **3.1.2 Materiales biológicos**

- Cuatro reproductores equinos: caballos españoles
- Eyaculados de caballo

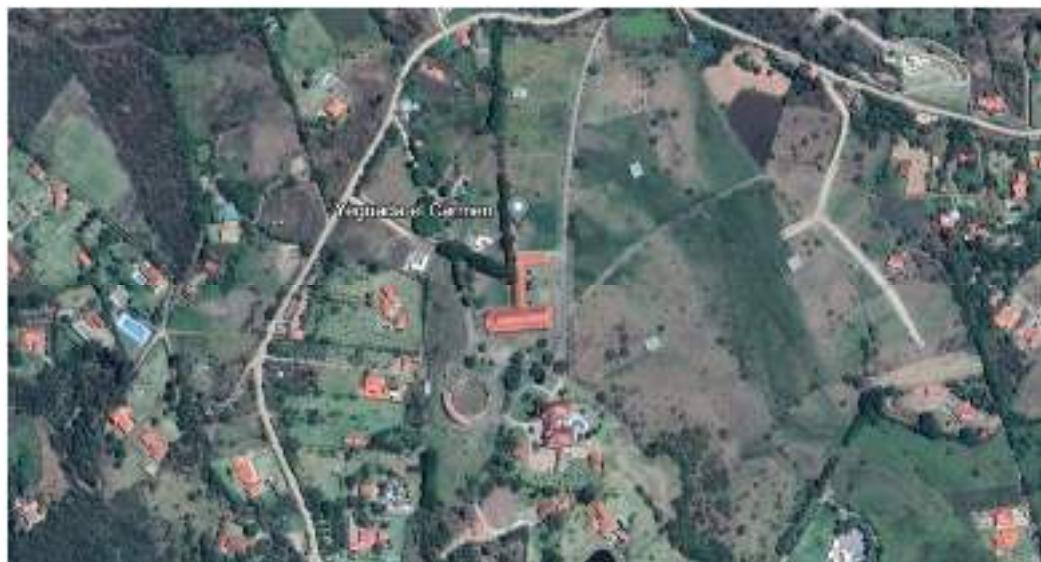
### **3.1.3 Materiales químicos y reactivos**

- Diluyente Botusemen-Special® (Ref: 550/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- Diluyente Botusemen-Gold® (Ref: 008/Botu/Special, BotuPharma, Brasil)
- N-Dimetilformamida (DMF) (Ref: D119-4)
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Sacarosa (S0389, Sigma – Aldrich)
- Trehalosa (T9531, Sigma – Aldrich)
- Rafinosa (R0250, Sigma – Aldrich)
- HEPES (Fluorescencia/ Salt, NaCl, KOH, glucosa, agua destilada)
- Yoduro de propidio (IP, P4170, Sigma – Aldrich)
- Aglutinina (PNA-FITC, L7381, Sigma – Aldrich)
- Tinción SpermBlue® (SB-250-N)
- Resina sintética

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Área geográfica de estudio

La recolección de semen de caballo se realizó en la Yeguada El Carmen, ubicada en la comunidad Lentag, perteneciente a la parroquia Asunción del cantón Girón de la provincia del Azuay (latitud -2,35; longitud -79,2333), a una altitud de 1.503 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 17°C.



**Figura 4.** Yeguada el Carmen (Lentag, Asunción, Girón, Azuay). Fuente: Google Earth, (2023).

El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicada en la Granja Irquis, área que se encuentra en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete cuyas coordenadas son (latitud -3,08; longitud -79,0752), a una altitud de 2.671 m.s.n.m. y una temperatura entre 12 y 18 °C.



**Figura 5.** Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal (Granja Irquis). Fuente: Google Earth, (2023).

### 3.2.2 Diseño experimental

El estudio realizado incluyó un total de 16 eyaculados provenientes de 4 caballos españoles adultos, fértiles y clínicamente sanos. El semen de cada caballo fue recolectado una vez por semana durante 4 semanas. Inmediatamente a la colecta, cada eyaculado fue diluido en una relación 1:1 con Botusemen-Special® y posteriormente fue transportado al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, donde inicialmente se evaluó la cinemática y morfometría de la muestra fresca. El semen diluido fue centrifugado a 400 gravedades durante 10 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en 5 ml de diluyente Botusemen-Gold®. A esta muestra se le llamó “muestra stock, cada muestra stock se dividió en 4 alícuotas y se ajustó a una concentración inicial de  $100 \times 10^6$  spz/ml.

Cada alícuota fue usada para elaborar los cuatro tratamientos según la adición del ACNP:

- 1. Congelación convencional (CC), control:** Se empleó el medio Botusemen-Gold® + 5% de DMF. Un total de 96 pajuelas fueron congeladas (6 pajuelas por eyaculado; 24 pajuelas / caballo).
- 2. Vitrificación con sacarosa (VIT-Sa):** Se empleó el medio Botusemen-Gold® + 1% de BSA +100 mM de sacarosa. Se vitrificó un total de 32 criotubos (2 criotubos /eyaculado; 8 criotubos /caballo).

3. **Vitrificación con trehalosa (VIT-Tre):** Se empleó el medio Botusemen-Gold® +100 mM de trehalosa + 1% BSA. Se vitrificó un total de 32 criotubos (2 criotubos / eyaculado; 8 criotubos /caballo).
4. **Vitrificación con rafinosa (VIT-Raf):** Se empleó el medio Botusemen-Gold® + 1% de BSA + 50 mM de rafinosa. Se vitrificó un total de 32 criotubos (2 criotubos / eyaculado; 8 criotubos /caballo).



**Figura 6.** Diseño experimental. Fuente: Los autores, (2023).

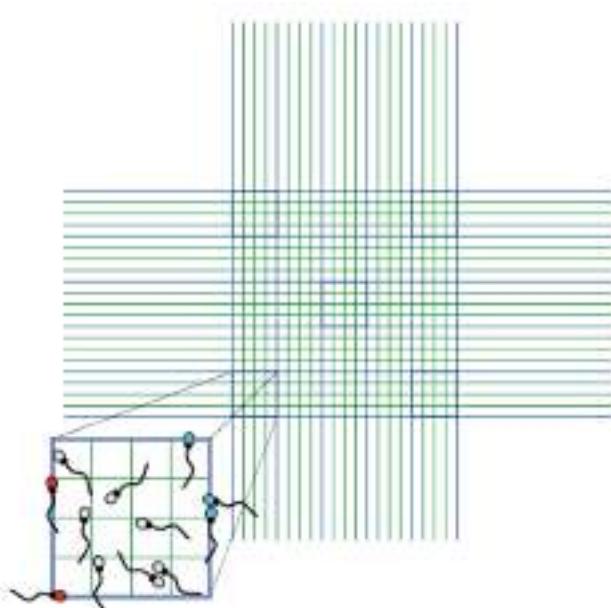
### 3.2.2.1 Recolección y transporte de semen

Para este proceso, se empleó una vagina artificial de tipo Hanover (rígida) la cual fue armada a una temperatura entre 45 y 50°C, de tal modo que al momento de la colecta esta había disminuido entre 38 y 39°C. Los tubos colectores con sus respectivos filtros fueron cubiertos con papel aluminio para evitar el contacto directo del eyaculado con la luz solar. Previo a la colecta se realizó un lavado del pene, con el fin de reducir la posibilidad de contaminación de la muestra. Concluida la colecta, las muestras obtenidas fueron fraccionadas en dos porciones, la primera para la evaluación en fresco y la segunda para el procesamiento y criopreservación, la cual fue prediluida en relación 1:1 con el diluyente comercial Botusemen-Special® previamente atemperado a 37°C. Inmediatamente, las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente (22°C) al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca.

### 3.2.2.2 Procesamiento del semen y asignación de tratamientos

Una evaluación inicial de la motilidad de las muestras frescas y diluidas fueron realizadas tomando 5 $\mu$ l de semen atemperado a 37 °C. La motilidad inicial, así como los parámetros cinéticos fueron medidos mediante el Sistema Computarizado CASA-SCA®.

Posterior a ello, se realizó la determinación de la concentración de la muestra de la muestra espermática, utilizando la cámara de Neubauer empleando la dilución 1:1 (muestra: diluyente), se tomó 10  $\mu$ l de la misma y se colocó en la cámara de Neubauer recubierta por un cubreobjetos y se procedió a contar los espermatozoides mantenidos dentro de los 5 cuadrantes usando un microscopio óptico de campo claro a 40X de magnificación, el total de espermatozoides contados se multiplicó por 10<sup>7</sup> (constante) y el valor obtenido fue expresado en millones (Galarza et al., 2018).



**Figura 7.** Conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer. Adaptado de Rodríguez, (2018).

Cada fracción de muestra prediluida 1:1, fue centrifugada a 400 gravedades durante 10 minutos, posterior a ello se procedió a extraer el sobrenadante de cada tubo falcón de 15 ml y el pellet obtenido fue resuspendido en 5 ml del diluyente Botusemen-Gold®, denominada muestra stock. Cada muestra stock se dividió en 4 alícuotas para los cuatro tratamientos respectivamente, ajustada a un volumen de 1ml y a una concentración inicial de 100 X 10<sup>6</sup> spz/ml. Para estas muestras iniciales se usó el diluyente Botusemen-Gold®. Inmediatamente, se adicionó a cada alícuota, 1 ml de medio Botusemen-Gold® + BSA (1%) con el doble de concentración de agentes crioprotectores de la siguiente manera: CC, 10% de DMF; VIT-Sa,

200 mM de sacarosa; VIT-Tre, 200 mM de trehalosa; y VIT-Raf, 100 mM de rafinosa. Como resultado de estas mezclas, se obtuvo un volumen final de 2 ml en cada alícuota y las concentraciones de 5% de DMF, 100 mM de sacarosa, 100 mM de trehalosa y 50 mM de rafinosa.

### **3.2.2.3 Congelación convencional**

Las muestras del tratamiento 1 se sometieron a un proceso de refrigeración a 5°C para equilibrar las muestras durante 2 horas. Luego de este proceso, se cargaron las muestras espermáticas en pajuelas de 0,5 ml y se sellaron con alcohol polivinílico (PVOH). Para su congelación se usó un sistema criogénico de dos rampas detallado por Tamay et al. (2022), en donde las pajuelas primero fueron colocadas en la rampa superior ubicada a una altura de 17 cm del nivel de NL<sub>2</sub> y se mantuvo durante 4 minutos; por consiguiente, las pajuelas fueron trasladadas a la rampa inferior que se encontró a 7 cm del nivel de NL<sub>2</sub> y se mantuvo durante 2 minutos. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas directamente en el NL<sub>2</sub> y se almacenaron a -196 °C hasta su descongelación y posterior análisis.

La descongelación de pajuelas se realizó sumergiéndolas en baño María a 37°C durante 30 segundos, seguido a ello el contenido de las pajuelas fue vaciado en tres tubos eppendorf obteniendo como resultado 3 réplicas por pajuela, las cuales se mantenían atemperadas en baño María a la temperatura antes mencionada. Posteriormente las muestras descongeladas fueron evaluadas su cinética, integridad de membranas y las medidas morfométricas de la cabeza del espermatozoide.

### **3.2.2.4 Vitrificación**

Las muestras de los tratamientos 2, 3 y 4 fueron equilibradas durante 1 hora a 5°C previo a la vitrificación. La VIT se realizó dejando caer gotas de 30 µl de los diferentes tratamientos de vitrificación, desde una altura de 15 cm directamente sobre el NL<sub>2</sub>. Los pellets formados fueron rescatados con un colador metálico y almacenados en criotubos de 2 ml, para luego ser transportados a un tanque de almacenamiento de NL<sub>2</sub> a -196°C hasta el calentamiento y su posterior evaluación.

El calentamiento de los pellets se realizó en el dispositivo de calentamiento “STC-3008” ajustado a una temperatura de 65°C según lo detallado por Galarza et al. (2023), los pellets se deslizaron en las platinas térmicas durante 3 segundos y el contenido fue recolectado en un vaso de precipitación de 10 ml, seguido a esto, la muestra fue centrifugada a 300 gravedades durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en

el diluyente Botusemen-Special®. De igual manera que en la descongelación se obtuvieron 3 réplicas por criotubo, las cuales se mantenían atemperadas en baño María a 37°C. Posteriormente las muestras calentadas de los tratamientos 2, 3 y 4 fueron evaluadas su cinética, integridad de membranas y las medidas morfométricas de la cabeza del espermatozoide.

### 3.2.2.5 Análisis de motilidad

La cinemática de las muestras espermáticas frescas y post-criopreservación de los tratamientos fueron evaluados analíticamente mediante el sistema computarizado CASA-SCA®, tomando 5 $\mu$ l de cada muestra y colocándolos en un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos, ambos previamente atemperados a 37°C. El sistema CASA-SCA® estuvo acoplado a un microscopio de contraste de fases y se registró los siguientes parámetros: motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidad promedio (VAP,  $\mu$ m/s), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu$ m), y frecuencia de batida del flagelo (Hz) en 3 campos con 200 trayectos de espermatozoides en promedio por cada réplica de los distintos tratamientos, luego dichos campos fueron limpiados manualmente.

### 3.2.2.6 Evaluación de la integridad de membranas

La integridad de membranas fue evaluada mediante la prueba de doble tinción fluorescente IP + PNA/FITC. La tinción de fluorescencia fue preparada mezclando 50  $\mu$ l de IP más 50  $\mu$ l de PNA/FITC aglutinina en ausencia de luz cubriendolos con papel aluminio hasta su uso. Posteriormente se tomó 30  $\mu$ l de muestra por cada réplica de cada tratamiento, la cual fue diluida en 200  $\mu$ l de HEPES (solución tampón) a una concentración promedio de  $20 \times 10^6$  spz/ml, y en las mismas condiciones de oscuridad se adicionó 10  $\mu$ l de tinción IP + PNA/FITC. Se analizaron cuatro subpoblaciones espermáticas mediante conteo celular (100 spz) en un equipo de epi-fluorescencia (excitación: 450–490 nm y emisión: 520 nm), según lo detallado por Tamay et al. (2022), las subpoblaciones a analizar fueron: IPIA, membrana plasmática intacta y acrosoma intacto; IPDA, membrana plasmática intacta y acrosoma dañado; DPIA, membrana plasmática dañada y acrosoma intacto; y DPDA, membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. Además, el total de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra (Total IP: IPIA + IPDA) y acrosoma íntegro (Total IA: IPIA + DPIA) fueron calculados.

### 3.2.2.7 Evaluación de morfometría de la cabeza de los espermatozoides

Finalmente se realizó un frotis colocando 10 µl de muestra y 12 µl de tinción SpermBlue® en el extremo de un portaobjetos, estas fueron homogenizadas y arrastradas con otro portaobjetos. Los frotis se secaron sobre la placa térmica para ser fijados con cubreobjetos largos empleando resina sintética, dicha técnica se describió previamente por Galarza et al. (2021). Posteriormente, el análisis de morfometría de la cabeza de los espermatozoides se realizó automáticamente utilizando el módulo ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*) del mismo sistema CASA-SCA®, tanto en muestras frescas y criopreservadas se analizaron 100 imágenes de cabezas teñidas a 60X aumentos, para obtener las dimensiones morfométricas: largo (L, µm), ancho (W, µm), área (A, µm<sup>2</sup>), perímetro (P, µm), elipticidad (L/W, µm), elongación ((L-W)/(L+W), µm), rugosidad (4πA/P<sup>2</sup>, µm) y regularidad (πLW/4A, µm), de los espermatozoides fijados.

### 3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las diferentes evaluaciones espermáticas fueron analizados en el software STATISTICA v.12., para Windows (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Previo a los análisis estadísticos, los datos fueron sometidos a la prueba de *Shapiro-Wilk* para determinar una distribución normal; aquellos datos que no siguieron una distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* o *Log-10* (porcentuales y numéricos, respectivamente). Se empleó un ANOVA unidireccional y la prueba *post Hoc de Bonferroni* para evaluar el efecto de los diferentes agentes crioprotectores no penetrantes (sacarosa, trehalosa y rafinosa) frente a la congelación convencional sobre la cinemática, integridad de membranas y dimensiones morfométricas de la cabeza espermática en muestras equinas frescas y criopreservadas. Además, el factor “reproductor” (caballo) fue incluido como covariante en este análisis debido a la variabilidad entre algunos caballos. El nivel de significancia fue considerado como (P < 0,05).

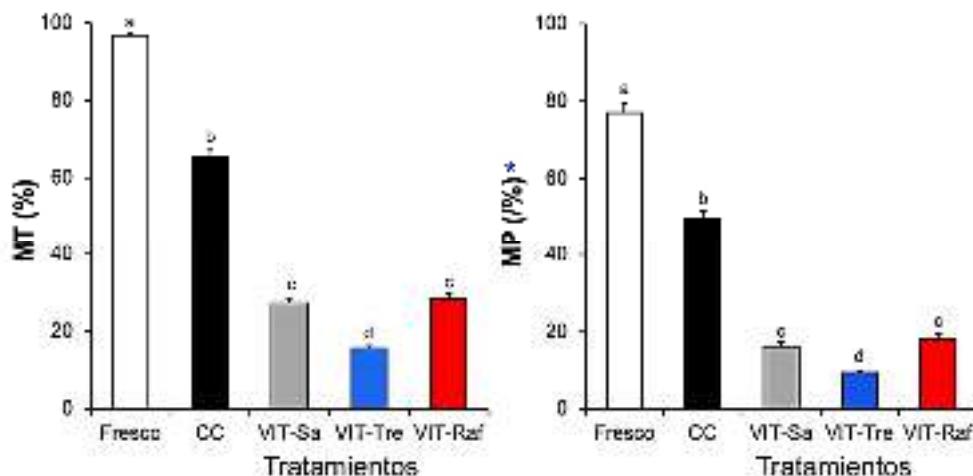
#### 4. Resultados

##### 4.1 Cinemática

Los parámetros cinemáticos de espermatozoides frescos y criopreservados de los diferentes tratamientos de congelación (CC) y vitrificación (VIT-Sa, VIT-Tre y VIT-Raf) se muestran en las **Figuras 8 – 11**.

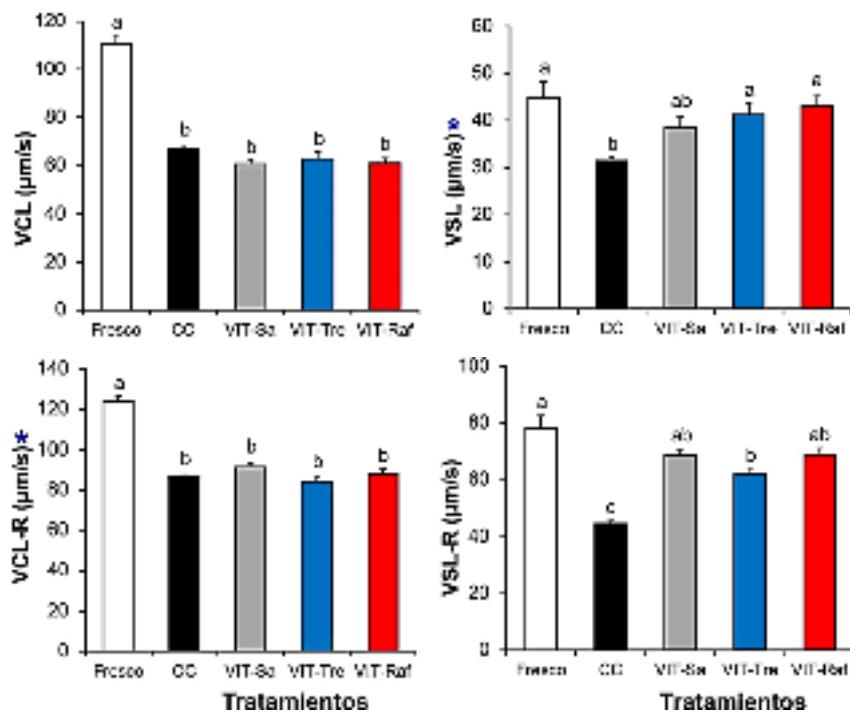
En general, los parámetros cinemáticos como las motilidades (MT y MP), velocidades curvilíneas (VCL y VCL-R) y la ALH fueron afectados por los procesos de criopreservación (congelación y vitrificación), debido a que sus valores se redujeron significativamente ( $P < 0,05$ ) después de los procesos criogénicos en comparación con sus valores referentes antes de la congelación (fresco). Además, el factor “reproductor” influyó en algunos parámetros cinemáticos tales como la MP, VCL-R, VSL, STR, LIN, WOB, ALH y BCF debido a que se evidenció diferencias significativas entre caballos ( $P < 0,05$ ).

El tratamiento de congelación convencional (CC) produjo mayores porcentajes ( $P < 0,05$ ) de MT y MP comparado con todos los tratamientos de vitrificación. No obstante, los espermatozoides vitrificados con sacarosa (VIT-Sa) y rafinosa (VIT-Raf) produjeron mayores porcentajes de MT y MP que aquellos espermatozoides vitrificados con trehalosa (VIT-Tre) (**Figura 8**).



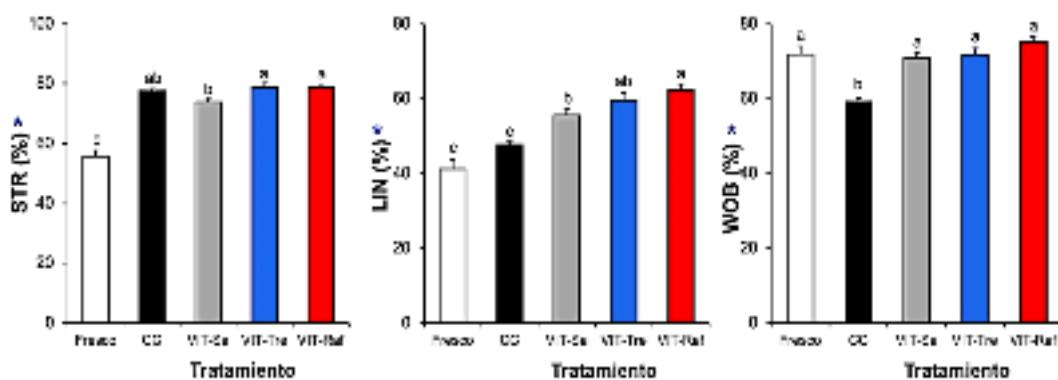
**Figura 8.** Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf). Asterisco indica diferencias significativas entre caballos \*  $P < 0,05$ . Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresa diferencias significativas entre tratamientos <sup>a-b-c-d</sup>,  $P < 0,05$ ; <sup>a-c, b-d, a-d</sup>,  $P < 0,01$ .

Los tratamientos VIT-Raf y VIT-Tre produjeron una velocidad rectilínea (VSL) superiores ( $P < 0,05$ ) al tratamiento CC; incluso alcanzaron valores de VSL similares a los espermatozoides frescos (sin criopreservar) ( $P > 0,05$ ). En el mismo sentido, todos los tratamientos de vitrificación alcanzaron valores más altos de velocidad rectilínea con trayectoria rápida y progresiva (VSL-R) que aquel tratamiento de congelación CC; incluso los tratamientos VIT-Sa y VIT-Raf alcanzaron valores similares de VSL-R a las muestras en fresco (**Figura 9**).



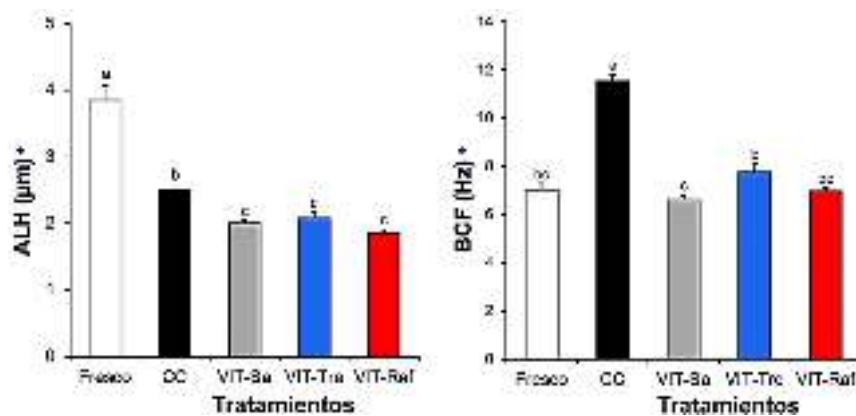
**Figura 9.** Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) con sus trayectorias progresivas rápidas (VCL-R y VSL-R) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf). Asterisco indica diferencias significativas entre caballos \*  $P < 0,05$ . Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresa diferencias significativas entre tratamientos  $a - b - c$ ,  $P < 0,05$ ;  $a - c$ ,  $P < 0,01$ .

Sorprendentemente, todos los tratamientos de congelación y vitrificación produjeron mayores porcentajes ( $P < 0,05$ ) de rectitud (STR) que su valor referencial en fresco (no criopreservados). Además, los tratamientos VIT-Tre y VIT-Raf mostraron un mayor porcentaje ( $P < 0,05$ ) de STR que aquel tratamiento VIT-Sa. En el mismo sentido, todos los tratamientos de vitrificación produjeron sorprendentemente mayores porcentajes ( $P < 0,05$ ) de linealidad (LIN) y oscilación (WOB) comparados con los tratamientos de congelación y/o fresco (**Figura 10**).



**Figura 10.** Rectitud (%), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf). Asterisco indica diferencias significativas entre caballos \* P < 0,05. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresa diferencias significativas entre tratamientos <sup>a-b-c</sup>, P < 0,05; <sup>a-c</sup>, P < 0,01.

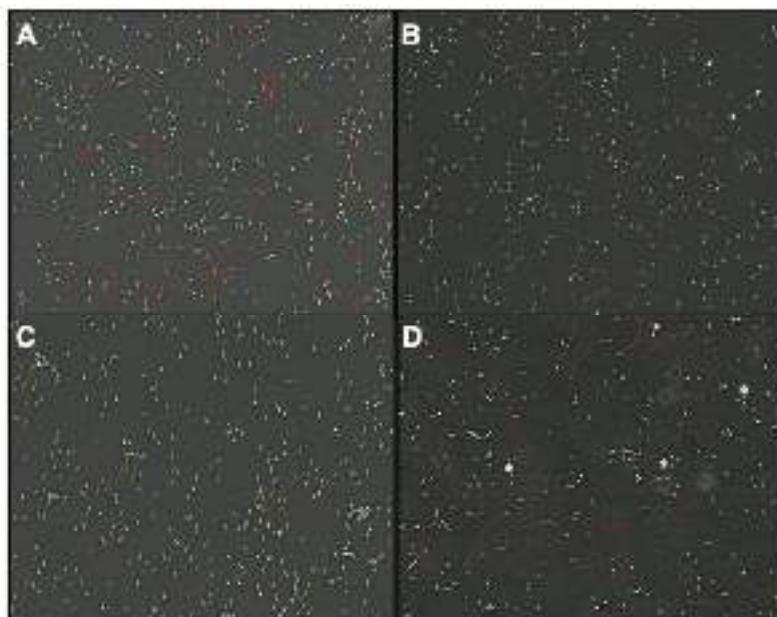
Los espermatozoides congelados convencionalmente (CC) produjeron valores más altos (P < 0,05) de ALH y BCF que todos los tratamientos de vitrificación. De hecho, el tratamiento CC obtuvo un valor de BCF superior (P < 0,05) al valor en fresco. Finalmente, el tratamiento VIT-Tre obtuvo un valor más alto (P < 0,05) de BCF en comparación con el tratamiento VIT-Sa (**Figura 11**).



**Figura 11.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de caballo congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf). Asterisco indica diferencias significativas entre caballos \* P < 0,05. Letras diferentes en cada barra y cada motilidad expresa diferencias significativas entre tratamientos <sup>a-b-c</sup>, P < 0,05; <sup>a-c</sup>, P < 0,01.



**Figura 12.** Registro de la cinemática de espermatozoides equinos frescos. Fuente: Los autores, (2023).



**Figura 13.** Registro de la cinemática de espermatozoides equinos después del proceso de criopreservación, evaluados mediante el sistema computarizado CASA-SCA®. A, congelación convencional (CC); B, vitrificación sacarosa (VIT-Sa); C, vitrificación trehalosa (VIT-Tre); D, vitrificación rafinosa (VIT-Raf). Fuente: Los autores, (2023).

#### 4.2 Integridad de las membranas plasmáticas

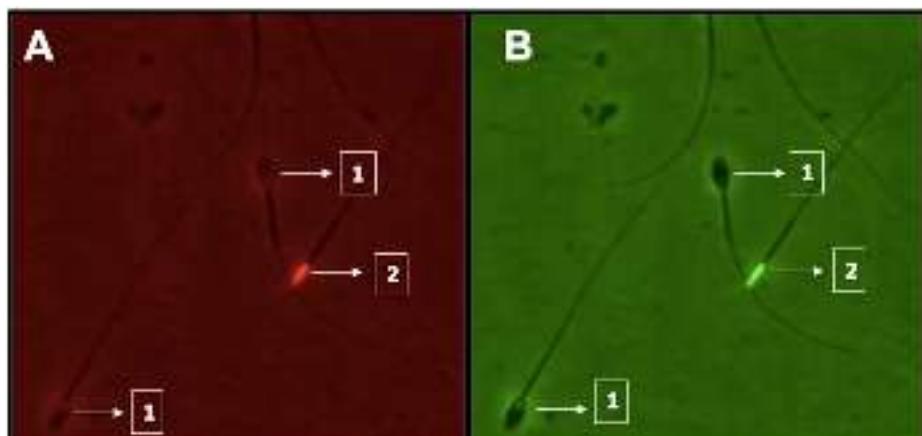
El análisis post-criopreservación del estado de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides equinos congelados y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes se muestran en la **Tabla 1**. El factor “reproductor” influyó en algunas categorías de espermatozoides tales como la IPIA y total IP debido a que se evidenció diferencias significativas entre caballos ( $P < 0,05$ ).

Los espermatozoides del tratamiento de congelación convencional CC produjo un mayor porcentaje ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides con integridad simultánea de la membrana plasmática y acrosomal (IPIA) y con integridad total de la membrana plasmática (Total IP) que todos los tratamientos de vitrificación. No obstante, en la vitrificación, los tratamientos VIT-Sa y VIT-Raf obtuvieron mayores porcentajes ( $P < 0,05$ ) de IPIA y total IP que aquel tratamiento VIT-Tre. Por otro lado, el tratamiento de congelación CC obtuvo menores porcentajes indeseables ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides con membrana dañada y acrosoma íntegro (DPIA) que todos los tratamientos de vitrificación; sin embargo, en la vitrificación, el tratamiento VIT-Tre produjo un mayor porcentaje de DPIA que el tratamiento VIT-Raf. En el mismo sentido, el tratamiento VIT-Tre produjo un mayor porcentaje indeseable ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides con la membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA) que todos los demás tratamientos. Finalmente, los tratamientos de vitrificación VIT-Sa y VIT-Raf obtuvieron mayores porcentajes de espermatozoides con integridad total del acrosoma (Total IA) que aquel tratamiento VIT-Tre (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Estado de las membranas espermáticas en diferentes categorías de fluorescencia (prueba IP / PNA-FITC) de espermatozoides equinos congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf).

Categorías de fluorescencia	Tratamientos			
	CC (n = 45)	VIT-Sa (n = 45)	VIT-Tre (n = 38)	VIT-Raf (n = 45)
IPIA (%) <sup>*</sup>	56,0 ± 1,84 <sup>a</sup>	40,0 ± 1,72 <sup>b</sup>	29,4 ± 1,33 <sup>c</sup>	42,9 ± 1,26 <sup>b</sup>
IPDA (%)	0,84 ± 0,19	0,67 ± 0,10	0,5 ± 0,18	0,78 ± 0,11
DPIA (%)	21,9 ± 1,26 <sup>c</sup>	39,0 ± 1,57 <sup>ab</sup>	44,2 ± 2,41 <sup>a</sup>	36,5 ± 1,23 <sup>b</sup>
DPDA (%)	21,2 ± 1,40 <sup>b</sup>	20,6 ± 0,66 <sup>b</sup>	25,8 ± 1,65 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,80 <sup>b</sup>
Total IP (%) <sup>*</sup>	56,8 ± 1,88 <sup>a</sup>	40,7 ± 1,70 <sup>b</sup>	29,9 ± 1,38 <sup>c</sup>	43,7 ± 1,27 <sup>b</sup>
Total IA (%)	77,9 ± 1,38 <sup>ab</sup>	79,0 ± 0,65 <sup>a</sup>	73,6 ± 1,70 <sup>b</sup>	79,4 ± 0,82 <sup>a</sup>

Diferentes superíndices en cada fila difieren significativamente entre tratamientos <sup>a-b-c</sup>,  $P < 0,05$ . Asterisco representa diferencias significativas entre caballos <sup>\*</sup>  $P < 0,05$ .



**Figura 14.** Registro de la integridad de membranas de espermatozoides equinos evaluados mediante la prueba de doble tinción fluorescente IP + PNA/FITC. A, filtro rojo IPIA (1) membrana plasmática intacta y acrosoma intacto; y B, filtro verde DPDA (2) membrana plasmática dañada y acrosoma dañado. Fuente: Los autores, (2023).

#### 4.3 Morfometría de la cabeza de los espermatozoides

El análisis de las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes se muestran en la **Tabla 2**. El factor “reproductor” influyó en algunas variables tales como el largo, anchura, área y elipticidad, debido a que se evidenció diferencias significativas entre caballos ( $P < 0,05$ ).

Todos los tratamientos de congelación y vitrificación incrementaron ( $P < 0,05$ ) sus valores de longitud y perímetro de la cabeza de los espermatozoides después del proceso criogénico en comparación con sus valores en fresco. Además, luego de vitrificar con el tratamiento VIT-Sa se evidenció un incremento significativo de la elipticidad en comparación con su valor en fresco.

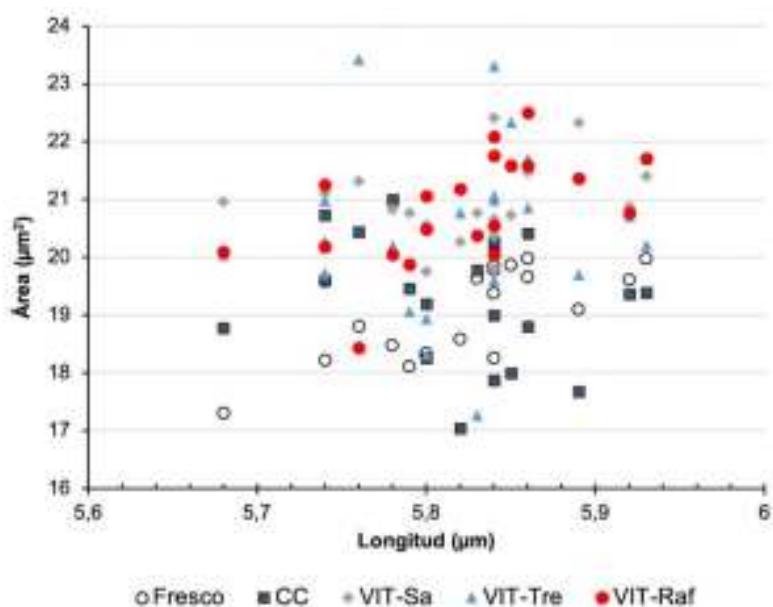
Los tratamientos VIT-Raf y VIT-Sa obtuvieron una longitud de la cabeza más alta ( $P < 0,05$ ) en comparación con aquellos tratamientos CC y VIT-Tre. Todos los tratamientos de vitrificación produjeron valores de anchura, área y perímetro de la cabeza de los espermatozoides criopreservados más altos ( $P < 0,05$ ) que el tratamiento de congelación CC (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides equinos congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf).

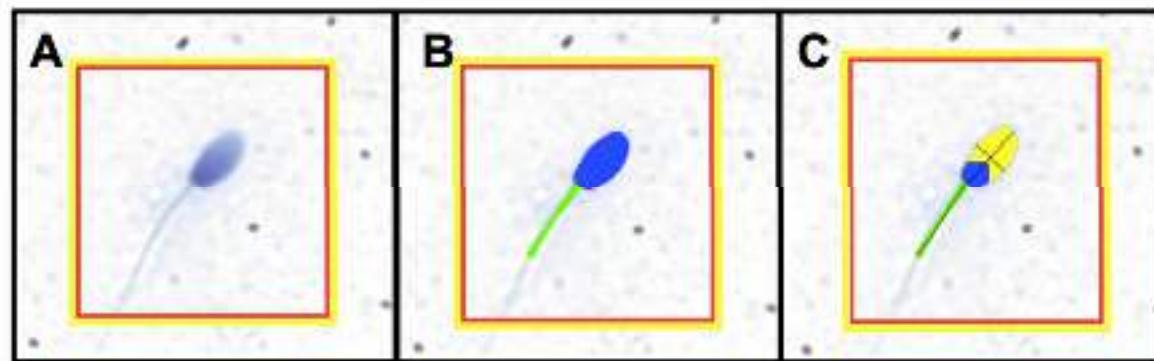
Dimensiones	Tratamientos				
	Fresco	CC	VIT-Sa	VIT-Tre	VIT-Raf
	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
Largo ( $\mu\text{m}$ ) <sup>*</sup>	5,82 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	6,09 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	6,39 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	6,20 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	6,35 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Anchura ( $\mu\text{m}$ ) <sup>*</sup>	2,97 $\pm$ 0,02 <sup>bc</sup>	2,93 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	3,04 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	3,07 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	3,05 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>
Área ( $\mu\text{m}^2$ ) <sup>*</sup>	19,0 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	19,3 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	20,9 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	20,5 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	20,8 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	12,8 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	13,2 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	13,8 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
Elipticidad <sup>*</sup>	1,97 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	2,10 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	2,12 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,03 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	2,10 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>
Elongación	0,32 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01
Rugosidad	1,46 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,01	1,38 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,01
Regularidad	0,73 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 0,00	0,74 $\pm$ 0,01

Diferentes superíndices en cada fila difieren significativamente entre tratamientos <sup>a – b – c</sup>, P < 0,05. Asterisco representa diferencias significativas entre caballos <sup>\*</sup> P < 0,05.

En la **Figura 15** se ilustra el tamaño de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados y vitrificados con sacarosa, trehalosa y rafinosa. En general, se denota que la mayoría de los espermatozoides vitrificados se ubican en un área superior a los espermatozoides frescos y los congelados convencionalmente. Nótese un mayor incremento del área y la longitud en espermatozoides vitrificados con sacarosa (plomo) y rafinosa (rojos).



**Figura 15.** Comparación de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides equinos frescos, congelados (CC) y vitrificados con diferentes agentes crioprotectores no penetrantes: sacarosa (VIT-Sa), trehalosa (VIT-Tre) y rafinosa (VIT-Raf). Los datos corresponden a la relación entre el área de la cabeza del esperma ( $\mu\text{m}^2$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ), medida en 100 espermatozoides / muestra ( $n = 20$ ) / tratamiento (total 2000 espermatozoides /tratamiento).



**Figura 16.** Registro de espermatozoides equinos teñidos con SpermBlue® evaluados mediante el módulo ASMA (*Automated Sperm Morphometry Analysis*) del sistema computarizado CASA-SCA®. A, espermatozoide teñido; B, medición del área y perímetro de cabeza (azul) y área de pieza intermedia (verde); y C, marcaje de acrosoma. Fuente: Los autores, (2023).

## 5. Discusión

Los resultados del presente estudio demostraron que la congelación convencional usando vapores de NL<sub>2</sub> y un sistema de doble rampa de congelación, produjo una mejor respuesta criogénica basada en una mejor cinemática e integridad de membranas de espermatozoides de caballos españoles en comparación a la vitrificación cinética, independientemente del tipo de agente crioprotector no penetrante. A pesar de ello, después de la vitrificación cinética, sorprendentemente se obtuvieron mayores valores de velocidad rectilínea, linealidad y oscilación espermática contrastados a los resultantes después de la congelación. Por otro lado, las muestras espermáticas vitrificadas con sacarosa y rafinosa demostraron una mejor cinemática e integridad de membranas plasmática y acrosomal que aquellas muestras vitrificadas con trehalosa. Además, se demostró que tanto la congelación como la vitrificación incrementaron las dimensiones de la cabeza (p. ej., largo y área) después de la criopreservación en comparación con su valor en fresco. Estos hallazgos sugieren que la vitrificación con sacarosa o rafinosa en esferas de 30 µl resulta ser una alternativa promisoria a la congelación convencional, no obstante, las lesiones criogénicas provocadas durante la criopreservación aún constituyen un hándicap tecnológico que necesita ser superado, por lo que se necesita más ensayos.

En investigaciones pioneras sobre el uso de las amidas (p. ej., DMF) como alternativa al uso del glicerol (debido a su alta osmolaridad y toxicidad a espermatozoides) en la criopreservación de espermatozoides de caballo se ha demostrado una similar respuesta criogénica en parámetros como la motilidad (Squires et al., 2004). Otros reportes indicaron que el uso de la DMF en la congelación de espermatozoides de caballo protegía eficientemente contra el daño criogénico (Alvarenga et al., 2005). El estrés osmótico puede provocar daño celular durante la congelación y descongelación de espermatozoides equinos (Galarza et al., 2023). En este sentido, se cree que la DMF tiene la capacidad para proteger al espermatozoide de caballo contra el choque de frío y la formación de cristales de hielo intracelular. Esta protección se basa principalmente, en la capacidad que tiene la DMF para introducirse a las células a través de la membrana plasmática (penetración transmembrana). Además, el bajo peso molecular (menor que el glicerol) de la DMF, permite que el flujo y eflujo de agua - crioprotector sea más rápido y eficiente durante la congelación y descongelación. Es por ello, que la DMF ha demostrado ser eficiente en la congelación de espermatozoides de caballos (Ochoa et al., 2022). Asimismo, estos efectos han sido evaluados en caballos categorizados como “malos congeladores” (conocidos como *bad freezers* en inglés) demostrando que la adición de la DMF al 5% (v/v) en un solo paso al medio de congelación,

mejoró las motilidades y supervivencia de los espermatozoides equinos (Pérez et al., 2018). Los resultados del presente estudio son consistentes con los mencionados anteriormente, dado que el uso de la DMF al 5% en la congelación de espermatozoides de caballos españoles (con diferencias significativas entre ellos) usando vapores de NL<sub>2</sub> y un sistema de congelación de dos rampas (Tamay et al., 2022), produjeron una motilidad y viabilidad entre el 56 y 70%.

La vitrificación cinética es un método alternativo de criopreservación de espermatozoides de caballo, que se realiza sumergiendo pequeños volúmenes (30 a 50 µl) de semen directamente en NL<sub>2</sub>, sin utilizar agentes crioprotectores penetrantes (ACP), pero con altas concentraciones de agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP). La adición de carbohidratos (p. ej., trehalosa 50 mM) al diluyente base da como resultado una mayor viscosidad de la solución que suprime la formación de cristales de hielo, por lo tanto, mejora el proceso de vitrificación (hasta llegar al estado vítreo) (Arav et al., 2002). Las velocidades de enfriamiento extremadamente altas (> 20.000°C/min), la concentración final del carbohidrato (50 a 100 mM), tiempo de exposición del ACNP a las células y el volumen de las muestras a vitrificar (en las esferas-pellets o pajuelas) influyen directamente en las lesiones celulares que se pueda tener durante este proceso (Isachenko et al., 2008). Las lesiones más comunes se dan a nivel de la membrana plasmática y membrana mitocondrial, que a términos prácticos se traduce a una disminución de la motilidad o muerte celular. Sin embargo, la gran ventaja de la vitrificación se centra en las altas concentraciones del ACNP, que obliga a que la célula se deshidrate y no se formen cristales de hielo intracelular durante su criopreservación (Galarza et al., 2023).

En estudios previos de diferentes especies, incluidos perros, peces, rumiantes silvestres (cabra montés ibérica) y equinos, se ha realizado exitosamente la vitrificación cinética mediante el método de esferas o pellets (Sánchez et al., 2011; Pradiee et al., 2015; Hidalgo et al., 2018). Nuestra investigación incluyó tres fuentes de carbohidratos, dos disacáridos (sacarosa y trehalosa) y un trisacárido (rafinosa) con dosis evaluadas previamente por Consuegra et al. (2019).

La sacarosa ha sido el carbohidrato utilizado principalmente para la vitrificación y congelación ultrarrápida del esperma en diferentes especies, incluyendo al humano, rumiantes, perros, e incluso caballos (Isachenko et al., 2008; Bóveda et al., 2018; Consuegra et al., 2019; Cerdeira et al., 2020; Galarza et al., 2021). La sacarosa adicionada al medio de vitrificación tiende a aumentar la viscosidad del medio extracelular y estabilizar la membrana plasmática del

espermatozoide (Chen et al., 1993). Una ventaja observada por Consuegra et al. (2019) y aprovechada en este estudio, fue la adición del 1% (p/vol) de BSA al medio de vitrificación. Los autores indicaron que la BSA ayuda en la estabilización de la membrana plasmática y proporciona cierta protección extra contra el choque de frío. En un estudio previo realizado por Consuegra et al. (2019), determinó que adicionando los 100 mM de sacarosa al medio de vitrificación se obtuvo una motilidad y viabilidad de espermatozoides de caballo alrededor del 55 – 60%.

Por otro lado, la trehalosa y la rafinosa pueden atrapar los radicales libres que conducen a la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, manteniendo su integridad (Bucak et al., 2013). La trehalosa también mejora la fluidez de la membrana del esperma y preserva la bicapa lipídica mediante la estabilización de la estructura del agua alrededor de la membrana, protegiendo a los espermatozoides de caballo contra el daño criogénico (Gheller et al., 2019). Contradictoriamente a los resultados obtenidos por Consuegra et al. (2019), y a pesar de que se usó la misma concentración de trehalosa (100 mM), el presente estudio produjo una menor crio resistencia y supervivencia con la trehalosa dado que la motilidad, cinética e integridad de membranas fueron significativamente más bajas comparándolos a los otros ACNP. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración óptima de carbohidratos difiere dentro de la misma especie, dado que en la vitrificación de caballos en volúmenes altos (pajuelas) y menor concentración (20 mM) ha producido mejores resultados de motilidad después del calentamiento (Hidalgo et al., 2018). Otros autores sugieren que los disacáridos (p. ej., sacarosa o trehalosa) empleados para la congelación o vitrificación ultrarrápida del esperma canino, reducen su motilidad más rápidamente durante la incubación posterior a la descongelación que los monosacáridos (p. ej., glucosa), probablemente porque los monosacáridos son metabolizados fácilmente por los espermatozoides (Le et al., 2019).

Un hallazgo importante de esta investigación es que la VSL, VSL-R, LIN y WOB no variaron después de la vitrificación con los tres carbohidratos, pero estos valores fueron mayores que los obtenidos después de la congelación, esto hace atractivo a este procedimiento de criopreservación de espermatozoides de caballo, dado que las membranas mitocondriales y axonemas posiblemente no fueron afectados durante la vitrificación. Galarza et al. (2021) y Bóveda et al. (2018), demostraron que, al usar un diluyente basado en tris, ácido cítrico, glucosa y yema de huevo (20%), la motilidad se redujo cuando se combinó con sacarosa. Este efecto negativo de la sacarosa sobre la motilidad se ha demostrado previamente tanto en eyaculados como en espermatozoides epididimarios de varias especies domésticas (perro y cobayo) y silvestres (muflón y gamo común). Celeghini et al. (2007) informaron que la

criopreservación ultrarrápida con 100 mM de sacarosa alteró la función mitocondrial y, en consecuencia, redujo la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación. La baja función mitocondrial del esperma criopreservado se produce debido a la reducción tanto de la fosforilación oxidativa como de la síntesis de ATP, por lo que las variables cinéticas del esperma también disminuyen (Ashrafi et al., 2011). Contradicoriamente a estas lesiones criogénicas causadas después de la vitrificación o congelación ultrarrápida, el presente trabajo produjo una mejor cinética después de la vitrificación; hemos planteado la hipótesis de que los carbohidratos equilibraron la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y de esa manera no se vio afectada la VSL durante y alrededor de la vitrificación debido a la adición de BSA como fue demostrado por Consuegra. (2017).

La protección de las membranas espermáticas depende de la concentración de los disacáridos usados en la vitrificación de espermatozoides (Koshimoto et al., 2000). En el presente estudio, a pesar de que la congelación convencional produjo una mayor integridad de las membranas plasmática y mitocondrial (56 - 60 %) de los espermatozoides equinos, la rafinosa (42,9 %) y sacarosa (40 %) produjeron una mayor protección (IPIA) en comparación con la trehalosa (29,4 %). Trabajos previos realizados en la vitrificación de espermatozoides ovinos, determinaron que la sacarosa a una concentración de 400 mM produjo una mejor protección y funcionalidad de la membrana plasmática (Arbulu, 2019).

Por otra parte, Consuegra et al. (2019) también valoró diferentes concentraciones de sacarosa adicionada con el 1% de BSA para la vitrificación de esperma de caballo y obtuvieron valores significativamente superiores con 100 mM de sacarosa en comparación con 20 mM y 200 mM para la integridad de la membrana plasmática (79,69 %) y acrosomal (56,59 %). En definitiva, aquellos autores determinaron que la sacarosa, a una concentración de 100 mM, fue recomendable para la vitrificación de esperma de caballo. Seguidamente Consuegra et al. (2019), continuaron desarrollando distintos protocolos de vitrificación espermática en la especie equina, como método alternativo de criopreservación, en donde nuevamente empleó sacarosa como estrategia para evitar el uso de crioprotectores permeables en la congelación de esperma de caballo, valorando el efecto de diferentes concentraciones de ACNP. Los autores determinaron que el esperma de caballo puede ser criopreservado en ausencia de crioprotectores permeables, usando una combinación de 100 mM de sacarosa y 1 % de BSA como crioprotectores alternativos. Los resultados de nuestra investigación son consistentes a lo detallado por Consuegra et al. (2019).

Álvarez et al. (2019) evaluaron el efecto de los diluyentes adicionados con trehalosa y lactosa, en la vitrificación del semen eyaculado y epididimario de sementales. El medio de vitrificación contenía INRA 96® + 1% de BSA y 150 mM de trehalosa o 150 mM de lactosa, ellos demostraron que la vitrificación de espermatozoides epididimarios de seminal mediante trehalosa podría ser una alternativa beneficiosa para el almacenamiento a largo plazo de muestras de esperma con un gran valor económico. Sin embargo, los espermatozoides vitrificados procedentes de eyaculados de caballos presentaron menores índices de viabilidad que las muestras sometidas a congelación convencional cuando se almacenaban con diluyentes que contenían trehalosa o lactosa. Posteriormente Álvarez. (2021), enfocó su investigación en valorar la calidad espermática del semen de burros (*Equus asinus*) ya que actualmente sigue dando resultados poco satisfactorios, inferiores a la de otros animales, incluidos los caballos. Nuevamente evaluó el uso de crioprotectores no permeables como la lactosa y trehalosa en la vitrificación de espermatozoides procedentes tanto de origen epididimario como de eyaculado, determinando que la vitrificación con trehalosa es una excelente alternativa siempre y cuando se utilice a una concentración de 150 mM incorporada al medio de vitrificación. Pérez et al. (2018), demostró un impacto negativo sobre la integridad del acrosoma y membranas plasmáticas, siendo afectadas gravemente en la vitrificación de espermatozoides equinos diluidos en varias concentraciones de sacarosa y/o trehalosa (30 mM, 150 mM y 500 mM). Cuando se llevó a cabo la vitrificación, la integridad del acrosoma también se redujo significativamente en todos los grupos de ACNP, sin embargo, no se encontró diferencias notables entre los dos disacáridos. La exposición de espermatozoides a ACNP no afectó a la integridad del acrosoma, pero la vitrificación indujo un gran efecto negativo en las membranas acrosómicas. Esto puede estar relacionado con una alteración de proteínas de membrana situadas en las regiones fosfolipídicas que se produce durante la transición de fase de los lípidos en el enfriamiento. Esta observación constituye un impedimento importante para utilizar esperma vitrificado para la inseminación artificial, y subraya la necesidad de buscar estrategias de protección del acrosoma y la membrana plasmática para mejorar la vitrificación de los espermatozoides.

Sin embargo, los resultados de otros estudios indican que la trehalosa fue más efectiva que la sacarosa como crioprotector no permeable para el almacenamiento de espermatozoides humanos (Schulz et al., 2017). Otro estudio concuerda que al usar 100 mM de trehalosa produce una mejor criorespuesta a comparación de la sacarosa y rafinosa (Consuegra et al., 2019). Lo cual es inconsistente con nuestra investigación, en donde la rafinosa a una concentración de 50 mM destacó sobre los otros tratamientos demostrando una mayor calidad espermática.

Las concentraciones de estos carbohidratos son factores clave para el éxito de la vitrificación (Isachenko et al., 2003; Hidalgo et al., 2018). En este sentido, en espermatozoides de burro la molaridad óptima llega hasta 250 mM de sacarosa (Sánchez et al., 2011; Díaz et al., 2017), mientras que con espermatozoides de otras especies como los de cabra montés ibérica, 100 mM es el máximo que se puede utilizar (Pradiee et al., 2015). Esto es particularmente relevante para el esperma de caballo, del que se ha informado previamente que tiene una resistencia relativamente menor a concentraciones mayores de carbohidratos (Consuegra et al., 2018; Hidalgo et al., 2018).

Se conoce que el estrés osmótico determina cambios en las dimensiones morfométricas de la cabeza (O'Brien et al., 2019). Además, se sabe que la forma y el tamaño de la cabeza de los espermatozoides pueden influir en su susceptibilidad al daño osmótico durante el proceso de congelación-descongelación, especialmente en poblaciones de espermatozoides más heterogéneas (Esteso et al., 2006). Se ha demostrado que la congelación ultrarrápida usando 100 mM de sacarosa provoca un aumento general en el tamaño de la cabeza del espermatozoide; este aumento se atribuye a una probable descondensación de la cromatina y la formación de ampollas en la membrana plasmática en la región de la cabeza de espermatozoides de perro (Cerdeira et al., 2020). Nuestro estudio demostró que los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el semen fresco de los diferentes reproductores equinos de la misma raza. Considerando el estudio de Buzón. (2013) el cual, de igual manera evidencia diferencias significativas en el semen fresco de reproductores equinos de diferentes razas, se puede deducir que las características morfométricas de los reproductores son propias de cada individuo. Arbulu. (2019) en su estudio utilizó sacarosa a una concentración de 400 mM, él demostró menores dimensiones para el área, longitud y ancho de la cabeza de los espermatozoides de ovino, al comparar el semen fresco y el congelado. Se observó que la anchura y la longitud de la cabeza son significativamente mayores en espermatozoides frescos que en las muestras de esperma vitrificadas. Los resultados de la presente investigación son inconsistentes al estudio mencionado anteriormente dado que la longitud y el área incrementaron significativamente tras la vitrificación, incluso la congelación.

Asimismo, Vázquez. (2023) en su investigación utilizó un disacárido (sacarosa) a una concentración de 100 mM, evaluó la longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación, rugosidad y regularidad de la cabeza, así como la anchura y área de la pieza intermedia de espermatozoides de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y mono chorongo (*Lagothrix poeppiggi*). Los resultados evidenciaron que después del proceso de

criopreservación en el venado de cola blanca, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides disminuyeron significativamente ( $P < 0,05$ ) en comparación con los valores de las muestras frescas y congeladas - descongeladas. Demostrando que los espermatozoides de venado de cola blanca tenían mejor crioresistencia a la congelación convencional que a la congelación ultrarrápida. De hecho, la congelación ultrarrápida reduce las dimensiones de la cabeza, lo cual es inconsistente con nuestra investigación en donde todos los tratamientos incrementaron el largo y área de la cabeza después del proceso criogénico en comparación con sus valores en fresco. No obstante, en la evaluación morfométrica de la cabeza de los espermatozoides de mono chorongo los resultados evidenciaron después del proceso de vitrificación que la longitud, anchura, área y perímetro de la cabeza aumentaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en comparación con sus valores de las muestras frescas y congeladas - descongeladas. Demostrando que los espermatozoides del mono chorongo se vieron drásticamente afectados por ambos tipos de criopreservación. A diferencia de los ciervos, la congelación ultrarrápida aumentó las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides del mono, lo cual apoya nuestra investigación.

### **Conclusiones**

Esta investigación concluye que la congelación convencional con dimetilformamida (DMF) produjo una mejor criosurvivencia de espermatozoides equinos que la vitrificación, independientemente del uso de la sacarosa, trehalosa y rafinosa. Además, la sacarosa y la rafinosa presentaron una mayor crioprotección durante y después de la vitrificación debido a una mayor motilidad, cinética e integridad de membranas de los espermatozoides de caballo. Finalmente, tanto la congelación convencional como la vitrificación cinética incrementaron las dimensiones morfométricas de la cabeza después del proceso criogénico. Se recomienda hacer más investigaciones sobre la capacidad fecundante de espermatozoides vitrificados.

## Referencias

- Aboagla, E., & Terada, T. (2003). Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1245–1250. <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/69/4/1245/2712656>
- Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, Erik., Liu, J., & Critser, John. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1493–1501. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005579>
- Aisen, E., Álvarez, H., Venturino, A., & Garde, J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053–1061. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00251-X)
- Aisen, E., Medina, V., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801–1808. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00653-2)
- Alarcón, V., García, W., & Bravo, W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(1), 58–64.
- Allinger, N., Cava, M., De Jongh, D., Lebel, N., & Stevens, C. (1984). Hidratos de carbono. In *Química orgánica* (2da Edición, p. 984).
- Alvarenga, M., Papa, F., Landim-Alvarenga, F., & Medeiros, A. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.07.001>
- Alvarenga, M., Papa, F., & Neto, C. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 33(3), 521-530.
- Álvarez, C. (2021). *Nuevas estrategias para mejorar la calidad espermática en la criopreservación de la especie equina* [Universidad de Zaragoza]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=293585&info=resumen&idioma=SPA>
- Álvarez, C., González, N., Luño, V., & Gil, L. (2019). Ejaculated compared with epididymal stallion sperm vitrification. *Animal Reproduction Science*, 211. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106205>

- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 77–81. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00700-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00700-6)
- Arbulu, A. (2019). *Nuevas estrategias para la criopreservación de esperma ovino mediante el uso de antioxidantes, gradientes y vitrificación*. <https://helvia.ucm.es/handle/10396/19024>
- Aretio, C. (2006). *Evaluación de la presencia de acrosina en espermatozoides caninos congelados sometidos a diferentes condiciones de capacitación in vitro*. Universidad de Chile.
- Ashrafi, I., Kohram, H., Naijian, H., Bahreini, M., & Mirzakhani, H. (2011). Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*, 4. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-547>
- Ávila, L., Madero, J., López Claudia, León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., & Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4).
- Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R., & Jamalzadeh, M. (2016). Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. *Veterinary Research Communication*, 41(1), 49–56.
- Baumber, J. (2011). Evaluation of semen. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (2nd ed., Vol. 1, pp. 1278–1291). Blackwell Publishing Ltd.
- Benjumeda, R., & Gómez, C. (2017). *La fertilidad: análisis del semen*.
- Berger, T. (1990). *Pisum sativum* agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Elsevier*, 33(3).
- Betancur, G., Mazo, L., & Duque-Cortés, J. (2016). Proliferación microbiana y calidad posdescongelación de semen equino criopreservado en presencia de antibióticos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 27(2), 316–325. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V27I2.11650>
- Beyer, H., & Wolfgang, W. (1987). *Manual de química orgánica* (S. A. Reverté, Ed.; 19th ed.).
- Blottner, S., Warnke, C., Tuchscherer, A., Heinen, V., & Torner, H. (2001). Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and

non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, 65(1–2), 75–88.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00214-1)

Bollwein, H., Fuchs, I., & Koess, C. (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*, 43, 189–195.

Borate, G., & Meshram, A. (2022). Cryopreservation of sperm: A Review. *Cureus*.  
<https://doi.org/10.7759/cureus.31402>

Bóveda, P., Toledano, A., Castaño, C., Esteso, M., López, A., & Rizos, D. (2018). Criobarrido y microscopía electrónica convencional de cabra montés (*Capra pirenaica*) criopreservación de esperma mediante protocolos de enfriamiento lento y ultrarrápido. *Reproducción En Animales Domésticos*, 53–113.

Brito, L. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249–264. <https://doi.org/10.1053/J.CTEP.2007.09.004>

Bucak, M., Ateşşahin, A., Varişli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060–1067.  
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.12.004>

Bucak, M., Çoyan, K., Başpınar, N., Taşpınar, M., & Aydos, S. (2013). Ergothioneine attenuates the DNA damage of post-thawed Merino ram sperm. *Reproductive Biology*, 13, 22. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2013.01.010>

Buzón, A. (2013). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer*. Universidad de Córdoba.

Caldevilla, M., Ferrante, A., & Neild, D. (2020). *Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Celeghini, E., De Arruda, R., De Andrade, A., Nascimento, J., & Raphael, C. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(5), 479–488.  
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2006.00810.X>

- Centola, G., Mattox, J., Burde, S., & Leary, J. (1990). Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev*, 130–135.
- Cerdeira, J., Sánchez-Calabuig, M., Pérez-Gutiérrez, J., Hijon, M., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2020). Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. *Cryobiology*, 95, 164–170. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIO.2020.03.007>
- Chen, Y., Foote, R., & Brockett, C. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30(4), 423–431. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1993.1042>
- Clulow, J., Maxwell, W., Evans, G., & Morris, L. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 232–235.
- Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Reproduction*, 42(2), 277–285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420277>
- Consuegra, C. (2017). *Vitrificación de esperma de caballo empleando crioprotectores no penetrantes*. Universidad de Córdoba.
- Consuegra, C., Crespo, F., Bottrel, M., Ortiz, I., Dorado, J., Díaz, M., Pereira, B., & Hidalgo, M. (2018). Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*, 191, 85–91.
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Díaz-Jiménez, M., Pereira, B., Ortiz, I., & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal Reproduction Science*, 206, 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.05.009>
- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Díaz-Jiménez, M., Pereira, B., Sánchez-Calabuig, M., Beltrán-Breña, P., Pérez-Cerezales, S., Rizos, D., & Hidalgo, M. (2021). Vitrification as an alternative to conventional techniques of stallion sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 223. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106627>
- Córdova, A., Pérez, J., & Martín, S. (2004). Fases previa y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides.

*Universidad y Ciencia, ISSN-e 0186-2979, Vol. 20, Nº. 40, 2004, Págs. 61-68, 20(40), 61–68.*

Cox, J., Fernandez, P., Saravia, F., & Santa, A. (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *SciELO*, 30(1), 93–99. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000100010>

Cuevas, R., Yang, H., Daly, J., Savage, M., Walter, R., & Tiersch, T. (2011). Production of F1 offspring with vitrified sperm from a live-bearing fish, the green swordtail (*Xiphophorus hellerii*). *Zebrafish*, 8, 167–169.

Dalal, J., Kumar, A., Dutt, R., Singh, G., & Chandolia, R. (2018). Different cooling rate for cryopreservation of semen in various livestock species: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 1903–1911.

Dascanio, J. (2014). Computer Assisted Sperm Analysis. *Equine Reproductive Procedures*, 368–372. <https://doi.org/10.1002/9781118904398.CH113>

De Leeuw, F., De Leeuw, A., Den Daas, J., Colenbrander, B., & Verkleij, A. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32–44. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1993.1005>

De Oliveira, R., Rodrigues, M., Souza, J., Moreira, T., Barros, V., & Dall'Acqua, P. (2019). *Inseminação artificial em equinos*. Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar.

Díaz-Jiménez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Partyka, A., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2017). Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 Suppl 4, 55–57. <https://doi.org/10.1111/RDA.13057>

Dutra, C., Graglia, F., & Martínez, M. (2013). *Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas. Comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial*.

Elgueta, C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*.

Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Soler, A. J., Montoro, V., Quintero-Moreno, A., & Garde, J. J. (2006). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of

- Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm heads. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(3), 241–246. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2006.00676.X>
- Estévez, V., García, M., & Gispert, B. (2009). *Inseminación artificial en caballos*.
- Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz de Assin, R., Zamora, S., Roldan, M., Rabelo, B., Ramírez, J., Yoldi, A., & Castilla, J. (2009). Bases of sperm cryobiology applied for sperm banks. *Asebir*, 14, 17–25.
- Fleming, A., Abdalla, E., Maltecca, C., & Baes, C. (2018). Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. *Archives Animal Breeding*, 61(1), 43–57.
- Galarza, A., Duma, M., Samaniego, J., Soria, M., & Méndez, S. (2023). *Cryopreservation of domestic and wild animal spermatozoa: Update of knowledge*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.111918>
- Galarza, D., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J., Méndez, S., Soria, M., Taboada, J., Sánchez-Calabuing, M., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra-rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.10.002>
- Galarza, D., López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192, 261–270. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.03.022>
- Garner, D., Pinkel, D., Johnson, L., & Pace, M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34, 127–138. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/34/1/127/2764244>
- Gheller, S., Corcini, C., de Brito, C., Acosta, I., Tavares, G., Soares, S., Silva, A., Pires, D., & Varela, A. (2019). Use of trehalose in the semen cryopreservation of Amazonian catfish *Leiarius marmoratus*. *Cryobiology*, 87, 74–77.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445–457.
- Gobato, M. (2020). *Efeito de diferentes diluentes na qualidade e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento Pêga (Equus asinus)*.

- Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., Papa, F., & Alvarenga, M. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, 58(2–4), 277–279.
- Gonzales, M., Rodríguez, C., Wong, Y., Llanos, J., & Gonzales, H. (2015). Uso de plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de equinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(2), 351–356.
- Graham, J., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen thawed semen. *Theriogenology*, 64, 492–504.
- Gutiérrez, L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal*. Universidad Complutense de Madrid. <http://hdl.handle.net/20.500.14352/38266>
- Hafez, B. (2000). Espermatozogénesis, Reproducción e inseminación en animales. In *Mc Graw Hill*.
- Hammerstedt, R., Graham, J., & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73–88.
- Hernández, L., Quintero, A., Camargo, O., & Rojas, M. (2017). Evaluation of the functional and structural integrity cryopreserved goat sperm by commercial extender. *Revista De La Facultad De Agronomía*, 27(1), 35–43.
- Hernández, P., Fernández, R., Rodríguez, J., Negrete, R., Soto, M., & García, R. (2012). Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. *Revista Salud Animal*, 34, 188–191.
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., Díaz, M., Ortiz, I., Pereira, B., Sánchez, R., & Crespo, F. (2018). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, 196, 91–98.
- Hu, J., Zan, L., Zhao, X., Li, Q., Jiang, Z., Li, Y., & Li, X. (2010). Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1657–1662. <https://doi.org/10.2527/JAS.2009-2335>

- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I., Dessoile, S., & Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. *Reprod. BioMed*, 6, 191–200.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J., Kreienberg, R., Katkov, I., Schulz, M., Lulat, A., Risopatrón, M., & Sánchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction (Cambridge, England)*, 136(2), 167–173. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0463>
- Izquierdo, A., Liera, J., Mancera, A., Pérez, J., Arroyo, G., & Mosqueda, M. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 22–40.
- Koshimoto, C., Gamliel, E., & Mazur, P. (2000). Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology*, 41(3), 204–231. <https://doi.org/10.1006/CRYO.2000.2281>
- Kumar, S., Millar, J., & Watson, P. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3)
- Lago, Y., Podico, G., Segabinazzi, L., Cunha, L., Barbosa, L., Arnold, C., Lima, F., King, L., Mclean, A., & Canisso, I. (2020). Donkey epididymal transport for semen cooling and freezing. *Animals*, 10(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ani10122209>
- Layek, S., Mohanty, T., Kumaresan, A., & Parks, J. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 179, 1–9.
- Le, T., Nguyen, T., Nguyen, T. A., Nguyen, V., Nguyen, T. T., Nguyen, V., & Cao, N. (2019). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology and cellular defects. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 234, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.01.001>
- Leibo, S., & Songsasen, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57(1), 303–326. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00673-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00673-2)

- Leslie, S., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J., & Crowe, L. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacterian during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3592. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.10.3592-3597.1995>
- Lessard, C., Danielson, J., Rajapaksha, K., Adams, G., & McCorkell, R. (2009). Banking North American buffalo semen. *Theriogenology*, 71(7), 1112–1119. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.12.004>
- Ley, W., Digrassie, W., Holyoak, G., & Slusher, S. (2002). Semen Quality. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*, 187–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-01317-8.50016-X>
- López, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J., Arana, P., Johnston, S., & Gosálvez, J. (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*, 68(9), 1240–1250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.029>
- Love, C. (2016). Modern techniques for semen evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3), 531–546. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- Macías, B., Fernández, L., Ferrusola, C., Salazar, C., Rodríguez, A., Martínez, H., & Peña, F. (2011). Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality y susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction Domestic Animals.*, 46.
- Madrid, N. (2004). *Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros fríos*. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria.
- Malo, C., Elwing, B., Soederstroem, L., Lundeheim, N., Morrell, J., & Skidmore, J. (2019). Effect of different freezing rates and thawing temperatures on cryosurvival of dromedary camel spermatozoa. *Theriogenology*, 125, 43–48.
- Martínez, M., Cabrera, P., Fernández, A., Díaz, T., Vivas, I., & Reyes, Y. (2011). Efecto de la concentración de crioprotectores sobre la viabilidad post vitrificación de embriones murinos (*Mus musculus*). *Revista Del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel,”* 42(1).

- Maxwell, W., Evans, G., Rhodes, S., Hillard, M., & Bindon, B. (1993). Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(1), 57. <https://doi.org/10.1071/RD9930057>
- Maynard, L., Loosli, J., Hintz, H., & Warner, R. (2012). *Nutrición Animal* (Mcgraw Hill, Ed.; 4th ed.).
- Maziero, R., Guaitolini, R., Guasti, P., Monteiro, G., Martin, I., Silva, J., & Papa, F. (2019). Effect of using two cryopreservation methods on viability and fertility of frozen stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72, 37–40.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), 125–142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mazur, P., Miller, R., & Leibo, S. (1974). Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *The Journal of Membrane Biology*, 15(1), 137–158. <https://doi.org/10.1007/BF01870085>
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C., Sinclair, L., & Wilkinson, R. (2011). *Nutrición Animal* (Acribia S.A, Ed.; 7th ed.).
- Mesa, A., & Henao, G. (2012). Effect of cholesterol and dimethylformamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm. *Rev.MVZ Cordoba*, 17(1).
- Meyers, S. (2012). *Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa*.
- Minen, R. (2021). *Caracterización funcional, cinética y estructural de enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares-alcoholes y de rafinosa en plantas. Obtención de herramientas moleculares con aplicaciones en procesos biotecnológicos y de biorrefinerías*. Instituto de Agrobiotecnología del Litoral.
- Morris, G., Acton, E., Murray, B., & Fonseca, F. (2012). Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 64, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.12.002>
- O'Brien, E., Esteso, M., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R., Guillamón, F., & Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means.

- Theriogenology, 129, 160–167.  
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.02.024>
- Ochoa-Guillen, J., Álvarez, D., Serpa, E., De la Cruz, F., Samaniego, J., Soria, M., & Galarza, D. (2022). Optimization of cryopreservation of arabian stallion sperm using dimethylformamide, glycerol, and different freezing protocols. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(111), 123–123.
- Oldenhof, H., Friedel, K., Akhoondi, M., Gojowsky, M., Wolkers, W., & Sieme, H. (2012). Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. *Mol Membr Biol*, 29, 95–106. <https://doi.org/10.3109/09687688.2012.674161>
- Ortega, C. (2001). *Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de sobrepopulaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos*. Universidad de Extremadura.
- Parra, C. (1997). *Análisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación*. Universidad de Murcia.
- Pérez, B., Sánchez, R., Yenes, P., & García, P. (2001). Estudio de la evolución de poblaciones de espermatozoides de verraco según su respuesta al HOST corto y el estado del acrosoma durante la conservación a 15°C. *6th International Conference on Pig Reproduction*.
- Pérez, C., Requena, F., Arando, A., Ortiz, S., Requena, F., & Agüera, E. (2018). Effect of trehalose and sucrose based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology*, 80, 62–69.
- Pérez-Osorio, J., Mello, F., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L., Henry, M. (2018). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction (AR)*, 5(3), 103–109. <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6076f7783717068b4797>
- Phillips, P., & Jahnke, M. (2016). Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 32(2), 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.008>
- Pommer, A., Rutllant, J., & Meyers, S. (2002). The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58(7), 1373–1384. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01039-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01039-7)

- Pradiee, J., Esteso, A., López, A., Toledano, C., Castaño, J., Carrizosa, B., Urrutia, J., & Santiago, M. (2015). "Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa." *Theriogenology*, 84(9), 1513–1522.
- Puga, T., Blum, X., Blum, M., Sorroza, N., Cajas, N., López, E., Narváez, A., & Aray, M. (2018). Relation between basal sperm morphology and sperm recovered by swim up. *Revista Científica Mundo de La Investigación y El Conocimiento*, 2, 111–123.
- Purdy, P. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Ramalho, J., Amaral, A., Sousa, A., Rodrigues, A., & Martins, L. (2007). Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 394–402.
- Ramónez, J., Landívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez, D. (2017). *Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación*.
- Ramos, E., Revelo, S., Muñoz, E., & Pérez, C. (2009). La trehalosa. Parte 1: su presencia en la caña de azúcar. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 43(2).
- Restrepo, G., Duque, C., & Montoya, J. (2012). Effect of two protocols of cryopreservation on fertilizing capacity of stallion (*Equus caballus*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 65(2), 6711–6718.
- Restrepo, G., Úsuga, A., & Rojano, A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 69–81.
- Reyes, E., Centurión, F., Espinosa, N., Peralta, J., & Segura, J. (2022). Efecto de los diluyentes Ley-Leygo y Triladyl y de dos tiempos de equilibrio en la congelación de semen de verraco. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 33(6).
- Robinson, N., & Sprayberry, K. (2012). *Terapéutica actual en medicina equina* (Sexta, Vol. 1). Inter Medica.
- Rocha, C. (2017). *Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características seminais e congelação do sêmen de garanhões*. Universidade de São Paulo.
- Rodríguez, A. (2018). Inseminación Artificial. In *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos* (1st ed., p. 271).

- Rodríguez, I. (2009). Inseminación artificial o monta dirigida en la yegua. *Universidad de Córdoba*, 5, 10–13.
- Rosddale, P. (1991). *Cría y reproducción del caballo*. Acribia.
- Rossi, A. (2012). *Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino*. Universidad Católica Argentina.
- Rubio, J. (2006). *Efecto de la criopreservación sobre la calidad seminal y la fertilidad de toros holstein, brahman y sus mestizos*. Universidad del Zulia (LUZ). Facultad de Agronomía (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría. 1-103 pp).
- Rubio, J., Quintero, A., & González, D. (2007). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de toros* (Vol. 19, Issue 4).
- Rusciano, G., Canditiis, C., Zito, G., Rubessa, M., Roca, M., & Carotenuto, R. (2017). Raman microscopy investigation of vitrification induced structural damages in mature bovine oocytes. *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177677>
- Samper, J., & Morris, C. (1998). Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49(5), 895–903. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98000399>
- Sánchez, R., Risopatron, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43, 233–241.
- Sandoval, R. (2005). *Criopreservación de semen ovino empleando diferentes diluyentes y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. Tesis Doctoral. Lima (Perú).
- Scherzer, J., Fayer-Hosken, R., Aceves, M., Hurley, D., Ray, L., Jones, L., & Heusner, G. (2009). Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Australian Veterinary Journal*, 87(7), 275–279. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2009.00452.X>
- Schulz, M., Risopatrón, J., Matus, G., Pineda, E., Rojas, C., Isachenko, V., Isachenko, E., & Sánchez, R. (2017). Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia*, 49(9). <https://doi.org/10.1111/AND.12757>

- Schwarz, M., & Koehler, J. (1979). Alteration in lectin binding to guinea pig spermatozoa accompanying in vitro capacitation and the acrosomal reaction. *Biology Reproduction*, 21, 1295–1307.
- Silva, P., & Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Squires, E. (2013). Semen cryopreservation-challenges and perspectives. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, 2, 136–139. [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)
- Squires, E. (2016). Breakthroughs in Equine Embryo Cryopreservation. The Veterinary clinics of North America. *Equine Practice*, 32(3), 415–424.
- Squires, E., Keith, S., & Graham, J. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.12.024>
- Storey, B., Noiles, E., & Thompson, K. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46–58. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1998.2097>
- Suárez, S., Katz, D., Owen, D., Andrew, J., & Powell, R. (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biology of Reproduction*, 44(2), 375–381. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD44.2.375>
- Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., & Ogawa, S. (1990). Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89(2), 511–516. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0890511>
- Tamay, E., Palacios, P., Peláez, G., Saa, L., Dorado, J., Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. (2022). Effect of melatonin and caffeine supplementation to freezing medium on cryosurvival of peruvian paso horse sperm using a two-step accelerating cooling rate. *Biopreservation and Biobanking*.
- Tiwari, S., Mohanty, T., Bhakat, M., Kumar, N., Baithalu, R., Nath, S., & Dewry, R. (2021). Comparative evidence support better antioxidant efficacy of mitochondrial targeted (mitoquinone) than cytosolic (resveratrol) antioxidant in improving in vitro sperm functions of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Cryobiology*.
- Tortolero, I., Arata, G., Osuna, J., Gómez, R., & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 3(3).

- Ugarelli, A., Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(1), 130–140. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V28I1.12947>
- Valenzuela, J. (2012). *Análisis de vías metabólicas en trigo transformado con los genes para síntesis de trehalosa*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Van Den Ende, W., & Valluru, R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: Scavenging and salvaging. *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern297>
- Varner, D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70(3), 448–462. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.023>
- Varner, D., Gibb, Z., & Aitken, R. (2015). Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, 47(1), 16–24. <https://doi.org/10.1111/EVJ.12308>
- Vázquez, A. (2023). *Evaluación morfométrica de espermatozoides de mamíferos silvestres criopreservados en el banco criogénico de la Universidad de Cuenca* <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/42342/1/Trabajo-de-Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Veloz, D. (2017). *Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (Análisis Seminal Asistido por Computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial*. Universidad de Cuenca.
- Vera, E., & Javiera, C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. <https://repositorio.udla.cl/xmlui/handle/udla/282>
- Vera, O. (2001). Reproducción bovina: Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. In Astro Data S.A. ed. (Astro data SA.).
- Warren, E., Borton, J., Hintz, A., & Harold, F. (1979). *El caballo*. Acribia, Zaragoza.
- Watson, P. (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. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>

- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Watson, P., & Fuller, B. (2001). *Principios de criopreservación de gametos y embriones*. En: Watson PF, Holt WV, Editores. Criobancos de Recursos Genéticos: ¿Conservación de La Vida Silvestre Para El Futuro? Nueva York: Taylor y Francis.
- Watson, P., & Martin, I. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(2), 153. <https://doi.org/10.1071/BI9750153>
- Wernli, J. (2010). *Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes. Reporte de caso. Artritis séptica en potros*.
- Woelders, H., Matthijs, A., & Engel, B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35(2), 93–105. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1997.2028>
- Xueli, Y., Yakun, X., Wu, H., Xian, G., Xiao, L., Wen, H., & et al. (2015). Successful vitrification of bovine immature oocyte using liquid helium instead of liquid nitrogen as cryogenic liquid. *Theriogenology*, 85(6), 1090–1096.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579–585. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00373-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00373-3)

## Anexos

Anexo A. Identificación de los reproductores.



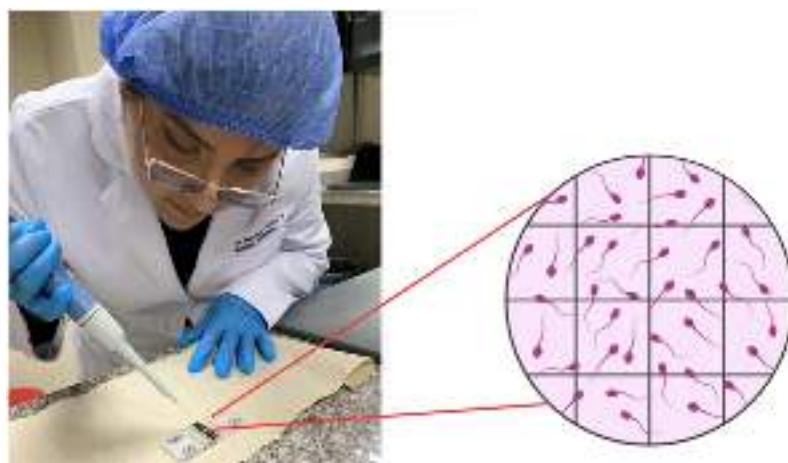
Anexo B. Armado de la vagina artificial tipo Hannover (rígida).



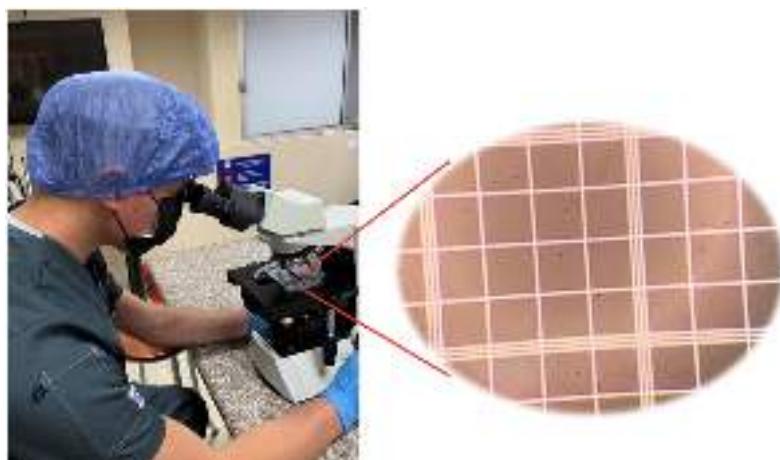
Anexo C. Reflejo de flehmen previo a la monta y evaluación visual del semen.



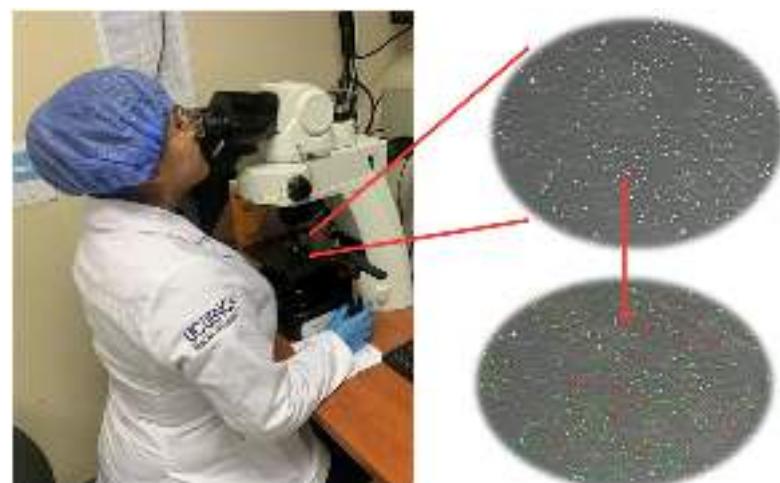
Anexo D. Colocación de la muestra espermática en la cámara de Neubauer.



Anexo E. Evaluación de la concentración de la muestra espermática.



Anexo F. Evaluación de la motilidad de la muestra fresca.



Anexo G. Pesaje de los ACNP.



Anexo H. Empajuelado en pajuelas de 0,5 ml previo a la congelación.



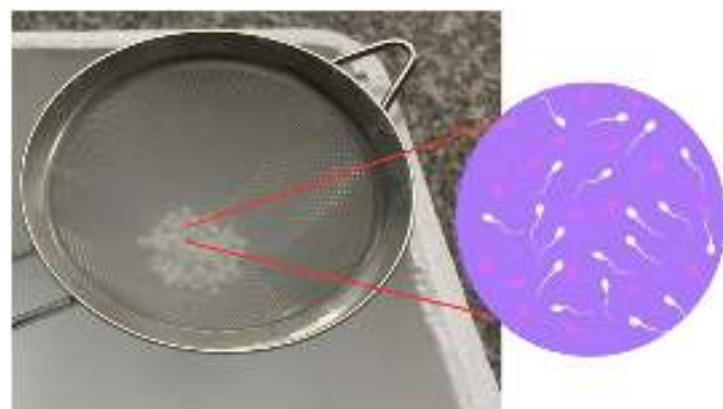
Anexo I. Congelación convencional de pajuelas en un sistema de dos rampas.



Anexo J. Vitrificación cinética de espermatozoides con ACNP.



Anexo K. Rescate de pellets de NL<sub>2</sub>.



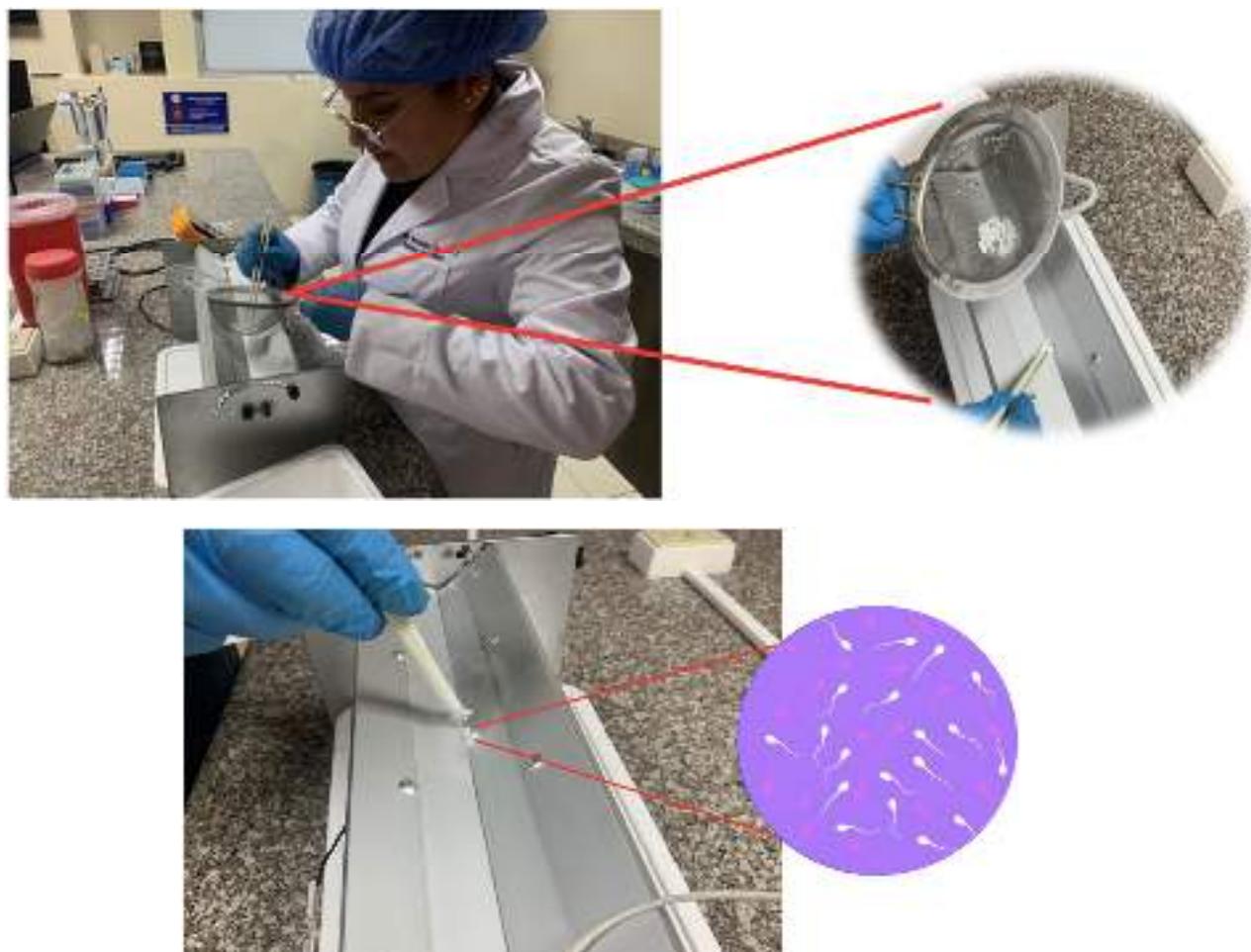
Anexo L. Extracción y descongelamiento de pajuela previo a la evaluación.



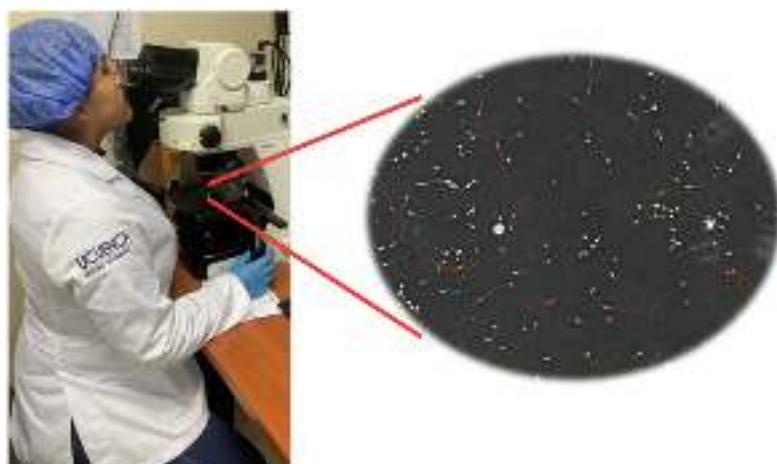
Anexo M. Preparación del dispositivo de calentamiento (STC-3008) y extracción de pellets.



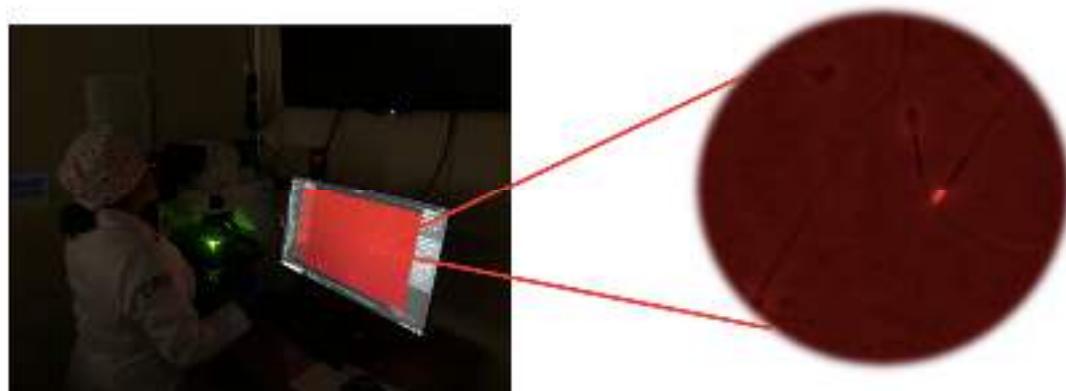
Anexo N. Calentamiento de pellets en el dispositivo (STC-3008) a 65°C.



Anexo O. Evaluación de la motilidad de las muestras descongeladas y calentadas.



Anexo P. Evaluación de la integridad de membranas acrosomal y plasmática mediante fluorescencia.



Anexo Q. Evaluación de la morfometría de la cabeza de espermatozoides equinos.

