

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

Criopreservación de espermatozoides de cobayo (*Cavia porcellus*) por congelación convencional lenta y ultrarrápida

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

Autores:

Christian Andrés Hernández Lojano

Anddy Josué Salinas Ulloa

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

Cuenca, Ecuador

2024-08-05

Resumen

El espermatozoide de cobayo se caracteriza por tener grandes dimensiones de la cabeza que puede influir en la criosupervivencia según el método de congelación utilizado. Esta investigación evaluó la respuesta criogénica de los espermatozoides epididimarios de cobayo criopreservados mediante congelación convencional (CC) y ultrarrápida (CU). Mediante orquiectomía, se recuperaron 40 testículos (izquierdos y derechos) provenientes de 20 cobayos adultos clínicamente sanos. Las muestras espermáticas de los testículos derechos fueron congeladas convencionalmente usando glicerol (3%), dimetilformamida (3%), albumina sérica bovina (1%) y exponiendo las muestras en pajuelas de 0,25 ml a vapores de nitrógeno líquido (LN₂) estático. Mientras que, las muestras de los testículos izquierdos fueron congeladas ultrarrápidamente usando sacarosa (100 mM), albumina sérica bovina (1%) y sumergiendo gotas de 20 µl directamente en LN₂. Los resultados demostraron una baja respuesta criogénica dado que todos los parámetros cinemáticos como las motilidades, velocidades y parámetros de relación de progresión, disminuyeron drásticamente luego de ambos métodos de criopreservación en comparación con sus valores pre-congelación ($P < 0,05$). Antes y después de la criopreservación, las muestras sometidas a congelación CU produjo una mayor motilidad total (MT) a comparación de aquellas muestras sometidas a congelación CC ($P < 0,05$). Los parámetros de motilidad progresiva, velocidades curvilínea y rectilínea con trayectoria rápida-progresiva, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), la integridad de las membranas plasmática y acrosomal (IPIA), y la integridad de ADN fueron mayores ($P < 0,05$) en las muestras congeladas ultrarrápidamente que en las muestras congeladas convencionalmente. No obstante, no se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) en las dimensiones morfométricas de la cabeza, ni antes, ni después de la congelación CC y CU. En conclusión, la congelación ultrarrápida dio lugar a una mayor criosupervivencia espermática basada en mejores motilidades, velocidades, integridad de membrana e integridad de ADN en comparación con la congelación convencional.

Palabras clave del autor: espermatozoide, cobayo, congelación convencional, congelación ultrarrápida



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

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

Abstract

The guinea pig spermatozoa are characterized by high head dimensions that can influence cryosurvival depending on the freezing method used. This research evaluated the cryogenic response of epididymal guinea pig spermatozoa cryopreserved by conventional freezing (CF) and ultra-rapid freezing (URF). Forty testicles (left and right) were recovered from twenty healthy, adult and fertile guinea pigs through orchiectomy. The sperm samples from the right testicles were conventionally frozen using glycerol (3%), dimethylformamide (3%), bovine serum albumin (1%) and exposed in 0.25 ml straws to static liquid nitrogen (LN₂) vapors. In contrast, the samples from the left testicles were ultra-rapidly frozen using sucrose (100 mM), bovine serum albumin (1%) and by directly plunging 20 µl droplets into LN₂. The results demonstrated that all kinematic parameters, such as motilities, velocities, and progression ratio parameters, drastically decreased after both cryopreservation methods compared to their pre-freezing values ($P < 0.05$). Before and after cryopreservation, the URF samples exhibited higher total motility (TM) than the CF samples ($P < 0.05$). The parameters of the progressive motility, curvilinear and straight-line velocities with rapid-progressive trajectory, amplitude of lateral head displacement (ALH), plasma membrane and acrosome integrity (IPIA), and DNA integrity were higher ($P < 0.05$) in the ultra-rapidly frozen samples than in the conventionally frozen samples. However, no significant differences ($P > 0.05$) were observed in the morphometric dimensions of the head, neither before nor after CF and URF. In conclusion, ultrafast freezing resulted in higher sperm cryosurvival based on better motilities, velocities, membrane integrity and DNA integrity compared to conventional freezing.

Author Keywords: spermatozoa, guinea pig, conventional freezing, ultra-rapid freezing



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
Objetivos.....	18
General	18
Específicos.....	18
Revisión de literatura	19
Características morfológicas de los espermatozoides de cobayo	19
Obtención de espermatozoides de cobayo	20
Recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo	21
Evaluación de semen fresco.....	21
Criopreservación	22
Congelación convencional lenta (CC)	23
Congelación ultrarrápida (CU).....	24
Agentes crioprotectores (AC)	24
Agentes crioprotectores penetrantes (ACP)	25
Glicerol (GLY).....	25
Dimetilformamida (DMF).....	26
Agentes Crioprotectores No penetrantes (ACNP)	27
Sacarosa.....	28
BSA (Albúmina Sérica Bovina)	29
Análisis Espermático Asistido por computador (CASA)	30
Cinética espermática	30
Morfología espermática.....	31
Las alteraciones de los espermatozoides se han catalogado en:	32
Concentración espermática	32
Integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal	32
Evaluación seminal por técnicas fluorescentes.....	33
Microscopía de fluorescencia.....	33

Materiales y Métodos	35
Materiales.....	35
Materiales físicos	35
Materiales biológicos	36
Químicos y reactivos.....	36
Métodos	36
Área de estudio.....	36
Diseño experimental	37
Recolección testículos y muestras espermáticas.....	40
Congelación convencional (CC)	41
Congelación ultrarrápida (CU)	42
Análisis de calidad espermática	43
Cinemática espermática	43
Estado de las membranas espermáticas	43
Evaluación de morfometría de la cabeza de los espermatozoides.....	44
Análisis Estadístico.....	45
Resultados.....	46
Cinemática espermática	46
Integridad de membranas.....	50
Integridad del ADN	51
Morfometría de la cabeza de espermatozoides de cobayo.	53
Discusión	55
Conclusiones	60
Anexos.....	77

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del espermatozoide de cobayo (Quispe,2018).	20
Figura 2. Estructura del glicerol (Pardo, 2021).	26
Figura 3. Estructura química de la Dimetilformamida (DMF; Giraldo & Jairo, 2011).	27
Figura 4. Estructura química de la sacarosa (Aguilar et al., 2012).....	29
Figura 5. Estructura y cavidades de la albúmina se suero bovino (BSA; Kumar et al., 2003). ...	30
Figura 6. Representación Esquemática de patrones de movilidad por el sistema Computer-Assisted Semen Analysis (CASA; Boyer et al., 1989).	31

Índice de tablas

Tabla 1. Diluyente tris, ácido cítrico y glucosa (TCG)	39
Tabla 2. Medio HEPES para epifluorescencia.....	39
Tabla 3. Yoduro de propidio (PI)	39
Tabla 4. Aglutinina (PNA-FITC).....	39
Tabla 5. Buffer de estabilización	40
Tabla 6. Tinción fluorescente simultánea para evaluación de la membrana plasmática y acrosomal	40
Tabla 7. Materiales para la recuperación espermática	40

Índice de acrónimos

$[(L-W) / (L+W), \mu m]$ = Elongación

$(4\pi A/P_2, \mu m)$ = Rugosidad

$(A, \mu m)$ = Área

$(L, \mu m)$ = Largo

$(L/W, \mu m)$ = Elipticidad

$(P, \mu m)$ = Perímetro

$(W, \mu m)$ = Ancho

$(\pi LW/4A, \mu m)$ = Regularidad

°C = Grados centígrados

µg = Microgramos

µl = Microlitros

µm = Micras

AC = Agente crioprotector

ALH = Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza

ACNP = Agente crioprotector no penetrante

ACP = Agente crioprotector penetrante

ADN = Ácido desoxirribonucleico

ANOVA = Análisis de Varianza

ARN = Ácido ribonucleico

ASMA = Análisis automatizado de Morfología de Espermatozoides (siglas en inglés, *Assisted Sperm Morphology Analysis*)

BCF = Frecuencia de batida de flagelo del espermatozoide

BSA = Albúmina Sérica Bovina

Ca⁺ = Calcio

CASA = Análisis Espermático Asistido por Ordenador (siglas en inglés, *Computer Assisted Sperm Analysis*)

CC = Congelación Convencional Lenta

cm = centímetro

CU = Congelación ultrarrápida

DMF = Dimetilformamida

DPDA = Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado

DPIA = Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto

FITC = Isotiocianato de fluoresceína

GLY = Glicerol

HEPES = Agente amortiguador de ácido sulfónico

Hz = Hertz

IP = Ioduro de propidio

IPDA = Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado

IPIA = Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto

K = Potasio

Kg = Kilogramo

KOH = Hidróxido de potasio

LIN = Índice de linealidad

M = Molar

MA = Membrana acrosomal

MAD = Movimiento Angular Medio

ME = membrana espermática

ml = Mililitro

mM = Milimolar

mm = Milímetro

MP = Motilidad progresiva

MT = Motilidad total

Na = Sodio

NaCl = Cloruro de sodio

Na₂HPO₄ = Fosfato de disódico

LN₂ = Nitrógeno líquido

Nm = Longitud de onda

PBS = Solución salina tamponada con fosfato

pH = Potencial de hidrógeno

RA = Reacción acrosomal

ROS = Especies de oxígeno reactivo

Esp = Espermatozoides

STR = Índice de rectitud

TCF = Tris, ácido cítrico y D-fructosa

TCG-YH = Tris, ácido cítrico, glucosa y yema de huevo (10%)

Tes = Test-Egg yolk solution

TRA = Técnica de reproducción asistida

Tris = Hidroximetil-aminometano

VAP = Velocidad media

VCL = Velocidad curvilínea

VSL = Velocidad rectilínea

VOW = Índice de oscilación

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a la Virgen del Cisne por brindarme fuerza, valor y guía en los momentos más difíciles, impulsándome a seguir adelante con mis estudios. A mis padres Emiliano y Teresa, por su amor, paciencia, consejos y constante aliento. A mis hermanos Mónica, Paola y Diego, por ser mi refugio y compañía en los momentos difíciles. A mi fiel compañera Cony, mi mascota, que ha estado durante este proceso, aunque no pueda leer estas palabras, sé que sientes mi gratitud y cariño. Por último, a mi amiga Jamileth por estar siempre presente y por brindarme estímulo y apoyo inquebrantable. Este trabajo es un homenaje a ustedes, una expresión sincera de mi gratitud y admiración.

Christian A. Hernández Lojano

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento a Dios y a la Virgen del Cisne, por brindarme salud y vida para alcanzar esta meta. Agradezco a mis padres por orientarme a lo largo de estos años. A mis hermanos, quienes estuvieron a mi lado en los momentos difíciles, brindándome su apoyo incondicional. Y a mi mascota, por ser mi fiel compañera y terapia, por hacer más llevadero este camino hacia este logro.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Diego Andrés Galarza, por darnos su voto de confianza, su capacidad para desafiarnos a pensar de manera crítica y por alentarnos en los momentos más adversos han dejado una huella imborrable en nuestra formación académica y personal.

Agradezco también a Anddy Salinas, mi compañero en este desafío, por su lealtad, por sus ideas y por su apoyo constante.

No puedo pasar por alto la labor del Dr. Fernando Pedro Perea y Dr. José Luis Pesantez, por llevar a cabo la revisión de este trabajo. Sin su conocimiento, compromiso y ayuda, este logro no sería posible.

A mis amigos y compañeros, quienes con su apoyo me ayudaron de una u otra forma a la consecución de este logro importante en mi vida.

Por último, mi agradecimiento al técnico docente del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, el Dr. Mauricio Dumas. Su invaluable guía, su dedicación, conocimiento y paciencia han sido fundamentales para el éxito de este trabajo.

A todos ustedes, mi más sincero reconocimiento y gratitud.

Christian A. Hernández Lojano

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado primero a Dios por darme sabiduría, resiliencia, y ayudarme en este largo recorrido. Agradezco también a mi madre Sandra por todo el amor, sacrificio, apoyo incondicional y por enseñarme la perseverancia, quien ha sido un pilar fundamental en este proceso y por su apoyo que me han motivado día a día a seguir adelante. También a mi hermano Byron que es alguien importante en mi vida, a pesar de todas las dificultades hemos podido salir adelante te agradezco por siempre estar presente y nunca dejar de creer en mí, gracias por todo tu apoyo, consejos, sabiduría. También a Carolina, María Elisa por su constante ánimo y por sus palabras de aliento y su fe que han sido esenciales para alcanzar esta meta. A mi novia Joseline gracias por todo su apoyo y amor en este largo recorrido. De igual manera a mis mascotas Kovu y Robin por su amor y compañía en los momentos más difíciles.

Anddy Josué Salinas Ulloa.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, mi madre, mis hermanos quien han sido mi motor para salir adelante en mi carrera. En especial por su apoyo y amor incondicional y sus consejos a seguir adelante y no darme por vencido durante mi carrera universitaria.

A nuestro director de tesis Dr. Andrés Galarza y al Dr. Mauricio Dumas por su comprensión y orientación, guía y su experiencia impartida que han sido muy importantes para el desarrollo durante el trabajo de investigación.

A mi compañero de tesis y amigo Christian Hernández por no darse por vencido a pesar de los obstáculos y dificultades presentadas a lo largo del camino.

A mis amigos y docentes gracias por todo el apoyo brindado y sus conocimientos impartidos durante mi carrera universitaria.

Anddy Josué Salinas Ulloa.

Introducción

El Cobayo (*Cavia porcellus*) conocido como cuy o conejillo de indias, es un mamífero roedor originario de la zona andina de Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia. El cobayo tiene un gran valor cultural, alimenticio, económico, incluso ancestral. La crianza tradicional de carne de cobayo ha contribuido a la seguridad alimentaria y ha proporcionado una fuente de ingresos económicos para determinada parte de la población ecuatoriana (Chauca, 1997). Por todo lo antes expuesto la crianza tecnificada de cobayos, sin duda, representa una actividad importante en la economía de la región interandina.

El consumo de carne de cobayo ha incrementado debido a su calidad basado en las altas concentraciones de proteína (19,3 a 20,3%) y ácidos grasos poliinsaturados (6 al 20%) que contiene (Sánchez et al., 2011). Por esta razón, es importante promover la conservación del material genético de cobayo mediante la aplicación de biotecnologías e innovaciones tecnológicas como se ha desarrollado en otras especies (FAO, WFP & IFAD, 2016).

La criopreservación de espermatozoides es una biotecnología reproductiva, que ha demostrado ser eficaz para conservar el material genético de varias especies de mamíferos domésticos y silvestres. Los espermatozoides criopreservados han sido usados eficientemente en técnicas de reproducción asistida (TRA) como la inseminación artificial (IA). Sin embargo, tanto la criopreservación espermática como la IA en cobayos ha sido limitada (Palomeque, 2021), debido a la baja o nula criosupervivencia espermática (Galarza et al., 2023), y a la falta de un protocolo estándar para la extracción y el mantenimiento de semen fresco (Solís & Chávez, 2015). Barahona & Quisphe., (2012) indicaron que la sincronización de cobayas es un procedimiento poco fiable. En este proceso, se debe observar el momento exacto en que la cobaya entre en celo para colocar al macho y la cubra. Si no queda gestante, se asume que ocurrió en proestro o metaestro. Además, la tasa de mortalidad de gazapos es de aproximadamente el 75% antes del destete (Roustan & Mailot, 1991).

El protocolo de congelación convencional (CC) más utilizado en espermatozoides usa un diluyente a base de tris, ácido cítrico, glucosa y glicerol, en pajuelas de 0,25 ml, se congelan exponiéndolas a vapores de nitrógeno líquido (LN₂; Estes et al., 2018). Algunos protocolos de criopreservación de espermatozoides de cobayo han sido empleados con resultados poco satisfactorios en términos de viabilidad y motilidad. Estudios realizados por Eder et al., (2013) en congelación convencional lenta demostró una motilidad y viabilidad espermática tras la

descongelación entre el 8 al 15%, este protocolo usó diluyentes a base de tris, tes, yema de huevo y la suplementación con 15% de glicerol, 10% de Ficoll PM70 y 2% urea. Aquellas muestras fueron cargadas en pajuelas de 0,25 ml y se congelaron exponiéndose a vapores LN₂ estáticos durante un tiempo determinado (Ej. 10 minutos). Se desconoce de más detalles proporcionados en la investigación mencionada anteriormente. Por otro lado, en un estudio realizado por Machuca, (2021) en el cual se intentó mejorar las velocidades de enfriamiento, utilizando dos rampas de congelación a dos alturas (24 y 10 cm) sobre el nivel de LN₂, pero la respuesta criogénica fue lesiva causando una mortalidad de aproximadamente el 70% de espermatozoides.

Se especula que la gran dimensión de la cabeza del espermatozoide de cobayo en conjunto con el gran tamaño del acrosoma dificulta el proceso de congelación y descongelación (O'Brien et al., 2019). Esto se basa en el hecho de usar velocidades de enfriamiento inicialmente altas (-5 a -25 °C/min), en este caso la célula no se deshidrata de manera eficiente y, consecuentemente, provoca la formación de cristales de hielo intracelulares letales (Machuca, 2021). Estos hechos detrimentales han sido previamente evidenciados en espermatozoides de otras especies silvestres como el visón europeo y el oso koala (O'Brien et al., 2019). Por estas razones, sería conveniente usar un protocolo de congelación que genere velocidades de enfriamiento inicialmente lentas (5 a 10 °C/min) y, luego de la nucleación de hielo, acelerar a velocidades altas (-50 °C/min) como lo ha demostrado Estes et al., (2018) y Galarza et al., (2020) en espermatozoides de rumiantes domésticos y silvestres. Como lo señalan Woelders & Chaveiro, (2004) en función de sus simulaciones matemáticas de velocidades de enfriamiento óptimas, sugirieron que los espermatozoides podrían lograr una mayor criosupervivencia, ya que el usar velocidades de enfriamiento iniciales lentas y luego más altas posterior a la nucleación del hielo provocaría una deshidratación y rehidratación óptimas durante los procesos de congelación y descongelación.

Otro efecto nocivo bien documentado que se produce durante la congelación convencional lenta es el aumento de las dimensiones morfométricas de la cabeza del espermatozoide. Estos cambios del tamaño del área y longitud de la cabeza de los espermatozoides son indicativos de sensibilidad de los espermatozoides al proceso de congelación y descongelación (O'Brien et al., 2019), debido a una condensación o dispersión de la cromatina (Fawcett & Hollenberg, 1963).

La congelación ultrarrápida (CU) es otro método de criopreservación que ha sido usado como una alternativa a la CC. La CU usa velocidades de enfriamiento extremadamente altas (> 20.000 °C/min) con altas concentraciones de agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP; Mazur, 1984; Galarza et al., 2021). Los ACNP usados en la CU son los disacáridos (Ej. sacarosa o trehalosa) y trisacáridos (Ej. rafinosa) suplementados al diluyente en concentraciones que van desde 100 a 250 mM. La CU se logra sumergiendo gotas (30 a 50 μ l) de muestras espermáticas con ACNP dentro de LN₂ (Mocé et al., 2010; Moreno et al., 2009).

Cabe recalcar que se ha demostrado que la CU de espermatozoides de mamíferos silvestres (gamo, muflón, gacela dama, jirafa y oso), usando un diluyente a base de TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa y yema de huevo al 10 – 20%) suplementado con 100 mM de sacarosa produjo resultados promisorios (aproximadamente 40%) de motilidad y la viabilidad, en comparación con la congelación CC (incluso con mejores resultados; O'Brien et al., 2019). Esto nos permite hipotetizar que el uso de esta técnica podría ser eficiente en la criopreservación de espermatozoides de cobayo.

Objetivos**General**

Evaluar la respuesta criogénica de los espermatozoides de cobayo criopreservados mediante congelación convencional y ultrarrápida.

Específicos

- a. Evaluar la cinemática, integridad simultánea de membranas e integridad del ADN de espermatozoides criopreservados con ambos métodos de congelación.
- b. Evaluar las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides congelados con ambos métodos de criopreservación.

Revisión de literatura

Características morfológicas de los espermatozoides de cobayo

En las especies animales, existen dos tipos de morfología espermática: los heteromorfos, que corresponden a los camélidos, y que exhiben una gran variabilidad en su morfometría espermática, dentro de un mismo animal, como entre diferentes animales (Cucho et al., 2021). En otro aspecto, los homomorfos se refieren a los cobayos, quienes presentan una sola morfología constante en sus espermatozoides, es decir, tienen una forma similar entre individuos (Cabeza et al., 2020).

Los espermatozoides son células, conformadas de una cabeza con un núcleo y acrosoma, además de una cola, necesaria para su motilidad (García, 2000).

a. Cabeza

Tiene forma oval con una medida de 8 micras, un núcleo aplanado, ovalado con cromatina homogénea compactada, unidas con histonas espermáticas (Chango, 2014). También posee vacuolas en el núcleo, con una membrana nuclear unida al ADN y protaminas espermáticas (Cabeza et al, 2020).

b. Acrosoma

Ubicado en el polo anterior de la cabeza, el acrosoma tiene forma de capuchón y una doble capa. Está conformado por enzimas estructurales como acrosina, hialuronidasa, esterasas e hidrolasas ácidas, quienes participan en el proceso de fecundación (Chango, 2014).

c. Cuello

Se encuentra entre la pieza media y la cabeza. Tiene un centriolo y nueve fibras periféricas comunicadas con la pieza media (Quispe, 2018).

d. Cola

Esta estructura mide 108,3 micras incluyendo el flagelo. Además, está dividida entre 3 segmentos: la pieza principal, intermedia y terminal. La pieza terminal, se asemeja a un cilio, la pieza intermedia está unida al flagelo y la pieza principal es como una hélice de la cola del

espermatozoide siendo la porción más larga; todas estas estructuras en conjunto le confieren a la cola la función de proveer movilidad al espermatozoide (Cabeza et al, 2020).

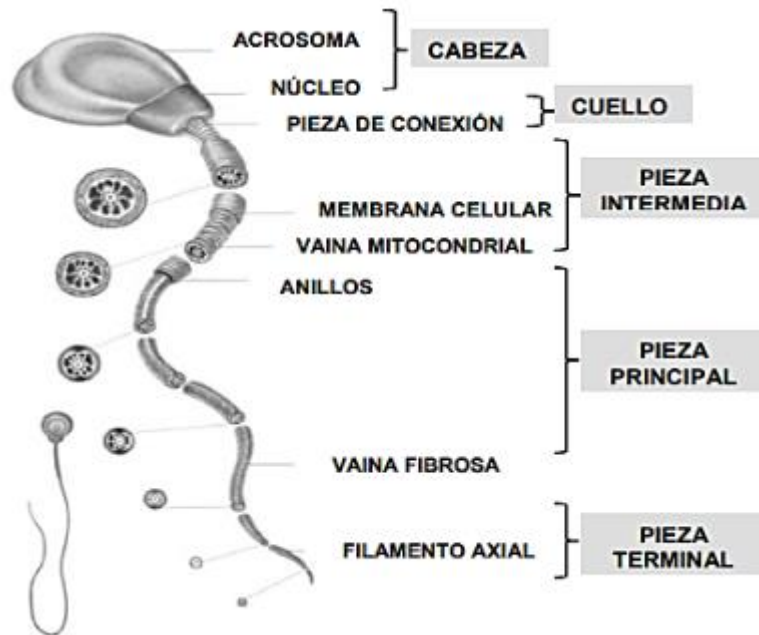


Figura 1. Estructura del espermatozoide de cobayo (Tomado de Quispe, 2018).

Obtención de espermatozoides de cobayo

Para recolectar espermatozoides epididimarios en cobayos la técnica consiste en extraer los testículos completos del animal (orquiectomía), o son recuperados post-mortem, estos espermatozoides fecundantes se almacenan en la cola del epidídimo y corresponden al material genético de un macho (Armas et al., 2011).

En el epidídimo se da la maduración y almacenamiento de espermatozoides. La maduración progresiva de los espermatozoides ocurre en la cabeza y cuerpo, mientras que su acumulación se produce en la cola del epidídimo (Hafez, 2002). La biotecnología ha evidenciado que los conocimientos de recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimarios en especies domésticas sobre todo en especies silvestres, que se encuentran en peligro de extinción, son de suma importancia como modelo de biotecnología (Ojeda & Diaz, 2000). La recuperación de espermatozoides puede ser post-mortem o post-orquiectomía de testículos, esto nos ofrece una oportunidad tener acceso a material genético de buena calidad y poder utilizarlo

en inseminación artificial en fresco o bien congelarlo y almacenarlo en nitrógeno líquido (Ponglowhapan & Chatdarong, 2008).

Recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo

1. Se localiza la cola del epidídimo tanto con el conducto deferente en los testículos.
2. Se hace la disección del conducto deferente como del epidídimo.
3. Se limpia con una gasa para retirar la mayor parte de solución o sangre y evitar contaminación de la muestra.
4. El tejido se coloca en una caja de poliestireno para conservar la temperatura.
5. Se realiza una incisión con una navaja de bisturí en la región más craneal de la cauda epididimaria.
6. Con una jeringa de 1 ml con aguja fina de 0,5 x 16 mm recortada la punta (sin filo), por el medio de extracción se procede a realizar un lavado retrógrado introduciendo la aguja por la luz del conducto deferente y con el diluyente adecuado “swim out”.
7. Una vez obtenida la muestra, se evalúa (Rodríguez et al., 2018).

Evaluación de semen fresco

Dentro de la evaluación macroscópica se evalúa el volumen y color, en el caso de la evaluación microscópica, esto permite determinar la concentración, motilidad, vitalidad, morfología e integridad de membranas (Lucio et al., 2009).

El volumen del eyaculado de un cobayo es de 0,6 a 0,8 cm³, el color es blanquecino y un pH ácido de 7, de acuerdo a resultados obtenidos de la recolección de un eyaculado en cobayos mediante electroeyaculador (Durrant, 1990). Se preparará una dilución homogenizada de diluyente con el semen a razón de 1:20, 1:10 o 1:50. Se debe determinar la concentración en millones/ml (IPCC, 2014), el promedio es de 2,9 a 35 x 10⁶ espermatozoides por eyaculado (Scott & Dziuk, 1959).

En un estudio realizado Freund, (1969) en 870 cuyes encontró una concentración de 13 a 376 x 10⁶ espermatozoides por eyaculado en muestras que fueron obtenidas por electroeyaculador. Los espermatozoides del cobayo se caracterizan de acuerdo a su motilidad porque tienen un movimiento curvilíneo y una progresión hacia delante de forma irregular (Wagner & Manning, 1976). Una vez obtenidas las muestras y evaluadas microscópicamente la motilidad, se indica la

vitalidad de los espermatozoides, que refleja la integridad de membranas y el metabolismo celular (Ortiz, 1999).

Para medir la motilidad masal se utiliza una escala de 0 (sin movimiento) a 5 (con un movimiento vigoroso), la cual se puede evaluar con la ayuda de un microscopio (Páez, 2012). Para la motilidad individual se utiliza una dilución isoosmótica, en el que se emplea la misma escala (IPCC, 2014). Se ha observado que los espermatozoides de cobayo alcanzan un 90% de motilidad individual (Caycedo, 2000).

Criopreservación

La criopreservación tiene la particularidad de que busca conservar la viabilidad y funcionalidad de las células mediante el almacenamiento a bajas temperaturas. En los últimos años, ha permitido almacenar células germinales de mamíferos durante periodos de tiempo prolongados utilizando soluciones crioprotectoras especiales, junto con nitrógeno líquido para mantener la integridad celular (Meyers, 2012). Un aporte importante de esta técnica es que puede emplearse cuando un animal muere de forma inesperada y se desea conservar su material genético. Esto se logra extrayendo espermatozoides de la cola del epidídimo para luego almacenarlos y congelarlos (Martins et al., 2007).

Se puede conservar espermatozoides, ovocitos y embriones de varias especies, tanto domésticas como silvestres, sin perder su capacidad de desarrollo (Cabodevila & Teruel, 2001), o al menos no alterarla en gran medida. Por lo tanto, el almacenamiento en bancos de recursos genéticos ayuda a mantener la variabilidad de una especie y asegura la permanencia de varias especies (González & Molfino, 2017).

La crioconservación de espermatozoides es una biotecnología, que consiste en la refrigeración de las muestras antes de llevarlas a temperaturas bajo cero, la refrigeración sirve para estabilizar las temperaturas entre 4 a 5 °C para así ser llevados a -196 °C, siendo esta la temperatura del nitrógeno líquido, en la cual se mantiene por tiempo indefinido (Chango, 2014; Ribeiro et al., 2014). Esta técnica de conservación en general tiene buenos resultados, sin embargo, también disminuye la capacidad fecundante y la fertilidad (Gonzalez, 2004).

De igual manera, está relacionada fuertemente con la velocidad y la curva de congelación, las cuales actuarán en las células y teniendo un impacto significativo con las lesiones celulares (Moore et al., 2006). Entre estas lesiones se incluyen la pérdida de la movilidad espermática

(Ortiz, 1999), así como alteraciones en la morfología, daño acrosomal, mitocondrias y la cola. La proporción de espermatozoides que logran resistir a estas condiciones y lesiones son bajas (Gonzalez & Conejo, 2009).

Existe escasa información sobre la criopreservación de espermatozoides de cobayos. Eder et al., (2013) utilizaron un diluyente compuesto por yema de huevo, 15% de glicerol, 10% de Ficoll y 2% de urea, logrando obtener un 10% de motilidad y un 50% de integridad acrosomal tras la descongelación. Además, Galarza et al., (2023) obtuvo resultados similares con TCG con un 20% de yema de huevo y un 5% de glicerol, mientras que Calderón & Pintado, (2023) utilizando TCG-YH 20% más un 10% glicerol obtuvieron 4,4% de motilidad.

Congelación convencional lenta (CC)

Es un protocolo de conservación que busca un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la deshidratación y la formación de cristales de hielo. En este método, se controla la velocidad de enfriamiento graduando el descenso de temperatura, esto ayuda a que los agentes crioprotectores penetrantes logren el equilibrio osmótico, sumado a esto, se reduce la formación de cristales de hielo dentro de las células. Esta técnica requiere de un descenso de temperatura de 0,2 a 0,3 °C por minuto para garantizar la viabilidad y funcionalidad celular (Herrán & Guevara, 2021).

La congelación convencional con rampas de enfriamiento lenta necesita de un tiempo de equilibrio a 5 °C de temperatura, este tiempo varía dependiendo de la especie y el origen de la muestra, para posteriormente ser llevadas las pajuelas a las gradillas metálicas en diferentes alturas en una caja de poliestireno, después se sumergen en nitrógeno líquido (Garde et al., 2003; Pradiee et al., 2015).

Dentro de este procedimiento se adiciona la yema de huevo que funciona como un aditivo para la protección de las células espermáticas durante la congelación y descongelación (Aboagla & Terada, 2004). Los medios estudiados recientemente para la congelación convencional no evitan la formación de cristales de hielo extra e intracelular, estos cristales tienen relevancia ya que afectan a la crioresistencia (Bóveda, 2021).

Congelación ultrarrápida (CU)

Es una alternativa reciente, descrita en diferentes estudios, consiste en un método de criopreservación ultrarrápida, en el cual se depositan pequeños volúmenes de muestra directamente sobre el nitrógeno líquido o sus vapores (Bóveda et al., 2020).

El método de congelación ultrarrápida es una técnica de bajo costo y de fácil de aplicación, que se usa dentro de la biotecnología porque evita la formación de cristales de hielo intracelular, favoreciendo el medio vítreo, la motilidad y el potencial de membrana (Isachenko et al., 2012). Para esta técnica, se necesita de concentraciones elevadas de crioprotectores, ya que tienen una alta toxicidad sobre las células espermáticas (Isachenko et al., 2003).

Existen protocolos que emplean concentraciones moderadas de agentes crioprotectores no penetrantes, un ejemplo de ello es la sacarosa (Pradiee et al., 2015). En el método de congelación ultrarrápida, la tasa de congelación varía entre 15.000 hasta 30.000 °C/min y tarda pocos segundos en completarse (Restrepo et al., 2010). Se forma una suspensión con agentes crioprotectores no penetrantes como la sacarosa y un diluyente a base de yema de huevo, que luego deben ser refrigeradas durante 30 minutos. Posteriormente, se forman gotas de 30 µl que se dejan caer directamente en nitrógeno líquido a una altura de 10 cm sobre la superficie, formando de esta manera esferas o pellets que se conservarán en criotubos sumergidos en LN₂. Para su descongelación, se necesita de al menos 24 horas de almacenamiento en LN₂ (Hernández et al., 2018).

Agentes crioprotectores (AC)

Los agentes crioprotectores sirven para minimizar los daños. Durante los procesos de congelación y descongelación estos agentes protegen las células vivas, proporcionando protección intra y extracelular. En la congelación convencional, se utilizan principalmente para evitar la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, desafortunadamente la formación de estos cristales no se evita por completo (Okazaki et al., 2009).

El descenso de temperatura implica que los espermatozoides alcancen la máxima concentración de solutos a bajas temperaturas, permitiendo que se deshidraten y que sufran poco estrés osmótico (Ávila et al., 2006). Con la ayuda de los crioprotectores, se previene la formación de hielo intracelular, disminuye las lesiones en la membrana, y evitan los efectos adversos de la

deshidratación excesiva, ya que los crioprotectores ingresan al medio intracelular, evitando el colapso celular (Vásquez et al., 2011).

Existen tres tipos de crioprotectores: alcoholes, azúcares y dimetilsulfóxido. Se pueden catalogar de acuerdo con su grado de protección contra la formación de cristales de hielo, su toxicidad química en las células y la velocidad para penetrar los tejidos (Ávila et al., 2006).

Agentes crioprotectores penetrantes (ACP)

Los agentes crioprotectores penetrantes son: glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol, metanol, propilenglicol y dimetilacetamida. Todos estos solutos pueden permeabilizar las células (Gao & Critser, 2000). Su mecanismo de acción, está relacionado con su capacidad de disminuir la concentración de electrolitos y evitar la formación de cristales de hielo que dañan la estructura de la membrana (Mazur, 1984).

Concretamente, estos agentes afectan al citoplasma, cambian velocidades de difusión y alteran las propiedades de la membrana a través de su inserción en la bicapa lipídica (Holt, 2000). Sin embargo, puede dañar a la célula e inducir cambios osmóticos de volumen a temperaturas superiores a 5 °C, lo cual representa un inconveniente porque necesitan permeabilizarse antes de la congelación y tienen que eliminarse rápidamente al descongelarse (Gao et al., 1995). Cabe señalar que la idoneidad de un agente crioprotector depende de la permeabilidad de la célula a dicho agente y de sus efectos citotóxicos específicos.

Glicerol (GLY)

Tiene un bajo peso molecular que permite su ingreso a los espermatozoides por medio de los canales acuaporina 7, facilitando el reemplazo del agua intracelular por ósmosis durante el proceso de congelación (Carlotto, 2009). A nivel extracelular, aumenta el volumen del medio y la proporción de agua en estado de no congelado, minimiza las concentraciones de los electrolitos y reduce los efectos de la solución. La deshidratación de las células por ósmosis contribuye a la disminución del volumen de agua y la prevención de formación de cristales.

Durante el proceso de congelación y el choque térmico, se producen cambios en las concentraciones de cationes. En este caso el glicerol impide la acumulación de Ca, al combinarlo con yema de huevo, citrato sódico y fructosa, lo que protege contra el influjo de Na y el eflujo de K. Sin embargo, el glicerol puede tener efectos tóxicos en las membranas plasmática de las

células; existe la probabilidad de que influya en la reorganización de fosfolípidos y proteínas de membrana, lo cual disminuye la capacidad fecundante y afecta tanto a las mitocondrias como a la membrana acrosomal (Castro, 2021).

La sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol varía según las especies, y encontrar la concentración óptima de glicerol para cada una implica en equilibrar sus efectos protectores y tóxicos (Canorio et al., 2015).

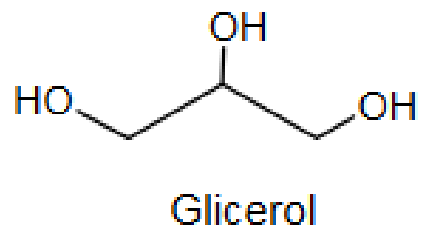


Figura 2. Estructura del glicerol (Tomado de Pardo, 2021).

Dimetilformamida (DMF)

Es un crioprotector penetrante a nivel celular con un bajo peso molecular, alta solubilidad en medios acuosos y baja toxicidad celular (Pineda & Pinilla, 2007). De la misma manera, reduce la formación de cristales de hielo intracelular (Alvarenga et al., 2005). Este al ser una amida puede reducir el daño osmótico. Existe poca información sobre el uso de las amidas como crioprotectores, pero se ha demostrado que el uso de la dimetilformamida, mejora la motilidad en la descongelación y preserva la integridad de la membrana celular (Pérez et al., 2014).

Mesa & Henao, (2012) realizaron un estudio en caballos criollos colombianos, comparando el uso de la DMF y glicerol, en sus resultados se evidenció una mejor motilidad, integridad de membrana y viabilidad, reportando una motilidad de 90,26% con DMF, mientras que con glicerol fue de 79,03%, con una diferencia significativa.

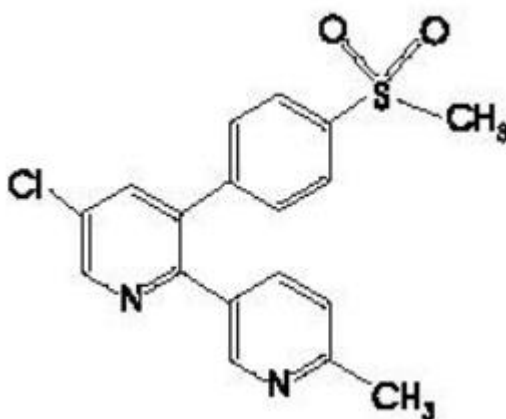


Figura 3. Estructura química de la Dimetilformamida (DMF; Tomado de Giraldo & Jairo, 2011).

Agentes Crioprotectores No penetrantes (ACNP)

Los ACNP generalmente son componentes de alto peso molecular, demasiado grandes para difundirse a través de las células. Son efectivos a elevadas velocidades de congelación, y facilitan la crioprotección al promover la rápida deshidratación celular. Estos agentes se utilizan junto con agentes crioprotectores penetrantes (Ávila et al., 2006).

Los ACNP forman puentes de hidrógeno con el agua, disminuyendo su acción a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. Además, aumentan la osmolaridad del espacio extracelular, lo que provoca la deshidratación celular y reduce la formación de cristales de hielo intracelulares. Se postula que algunos crioprotectores no penetrantes pueden absorberse en las superficies de las membranas (Swain & Smith, 2010).

Se tiene en cuenta factores como el tiempo de exposición, la concentración del crioprotector y la temperatura de exposición, ya que influyen en el efecto del agente crioprotector, lo que a su vez disminuye el estrés osmótico en las células durante la congelación (Fernández et al., 2009).

Los agentes crioprotectores no penetrantes se clasifican en:

- **Crioprotectores de alto peso molecular:**
 - **Azúcares:**
 - Monosacáridos (glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, xilosa, manosa),

- Disacáridos (sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa).
- Polisacáridos (rafinosa, dextrano).
- **Crioprotectores de bajo peso molecular:**
 - **Macromoléculas/polímeros:**
 - Ficoll, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, hialuronano.

La finalidad es buscar la idoneidad de un agente crioprotector bajo ciertos criterios, sobre la motilidad, la capacitación y la capacidad de fecundación. Además, factores como: el tiempo de exposición, la concentración del crioprotector y la temperatura de exposición influyen en su efectividad. También, se tiene en cuenta aspectos como: periodos cortos de tiempo, la exposición prolongada o concentraciones elevadas, ya que pueden afectar al metabolismo de los agentes crioprotectores, lo que posteriormente puede alterar la función y la viabilidad (Fernández et al., 2009).

Los daños inducidos por la exposición inadecuada de los crioprotectores van desde la eliminación o fusión de las membranas celulares, hasta el deterioro de la actividad enzimática y la alteración de la estructura y función de los orgánulos (Swain & Smith, 2010).

Sacarosa

Es un disacárido del grupo de hidratos de carbono y soluble en agua, formado por dos moléculas de monosacáridos. Está compuesto por O- α -D-glucopiranosil-(1-2)- β -D-fructofuranósido (Maynard, 2012).

La sacarosa tiene una acción crioprotectora sobre la integridad de membranas y el equilibrio de proteínas durante la deshidratación y rehidratación celular en la criopreservación. Investigaciones realizadas por Aisen et al., (2000), demostraron que al evaluar la motilidad post-descongelamiento en espermatozoides de carnero, obtuvieron resultados mayores con la presencia de sacarosa con relación a la adición de glucosa, evidenciando la eficacia de la crioprotección en disacáridos.

De igual manera, investigaciones realizadas por Shi et al., (2018), demostró que la sacarosa al 10% es tan eficaz como la rafinosa al 18% en presencia de leche desnatada al 3% para la criopreservación, al evaluar: motilidad espermática, la integridad del ADN y la fertilidad del espermatozoides en una cepa de ratones C57BL/6J.

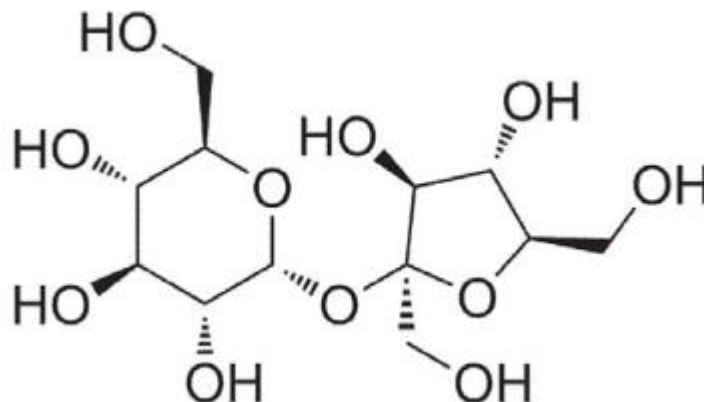


Figura 4. Estructura química de la sacarosa (Tomado de Aguilar et al., 2012).

BSA (Albúmina Sérica Bovina)

Es una proteína que se encuentra de forma natural en el semen de mamíferos (Rayan et al., 2023). La adición de BSA a los espermatozoides puede mantener eficazmente su calidad durante el periodo de criopreservación. Una de las principales características del BSA es su capacidad antioxidante, que elimina los radicales libres creados por el estrés oxidativo. Además, como crioprotector, puede absorberse en la superficie del espermatozoide para preservar la fluidez e integridad de la membrana (Rahimizadeh et al., 2021).

La BSA también mejora la motilidad y la viabilidad del semen eyaculado tras el proceso de congelación y descongelación (Salamon & Maxwell, 2000). En estudios realizados en diferentes especies, se ha observado que la adición de BSA mejora la supervivencia de espermatozoides criopreservados. Por ejemplo, al adicionarla en un 10% en el esperma epididimario de carnero demostró una viabilidad espermática significativa (Rahimizadeh et al., 2021). En cambio, en espermatozoides de toro se ha evidenciado que los ácidos grasos presentes en el BSA como suministro energético, aumentan la producción de ATP tras el almacenamiento (Sariözkan et al., 2009).

Otro efecto de la BSA es modificar la composición lipídica del espermatozoide eliminando el colesterol de la membrana plasmática, lo que preserva la fluidez e integridad de la membrana durante la criopreservación (Rahimizadeh et al., 2021).

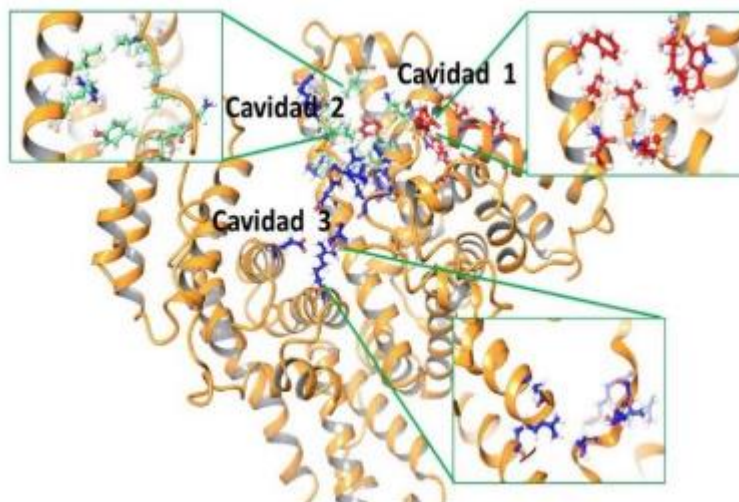


Figura 5. Estructura y cavidades de la albúmina de suero bovino (BSA; Tomado de Kumar et al., 2003).

Análisis Espermático Asistido por computador (CASA)

El Análisis Espermático Asistido por Computador (CASA-SCA®, Computer Assisted Sperm Analysis) permite la evaluación precisa, automática y objetiva de espermatozoides. En general, los informes del sistema CASA evalúan los siguientes aspectos dentro una población espermática: el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos y estáticos, morfología y morfometría, concentración y valores de cinética (Varner, 2008).

Cinética espermática

Se evalúa en distintas condiciones de contraste de iluminación, aumento y tiempos de captura. Este análisis permite medir el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo (Valverde & Madrigal, 2018).

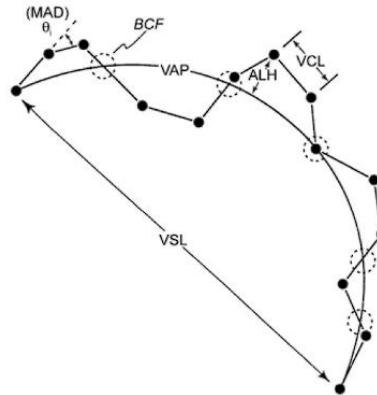


Figura 6. Representación Esquemática de patrones de movilidad por el sistema Computer-Assisted Semen Analysis (CASA; Boyer et al., 1989).

La linealidad de los círculos negros representa las imágenes de la cabeza del espermatozoide en movimiento, que se encuentra conectados por líneas rectas. Se utilizan varios parámetros, como el desplazamiento angular medio (MAD), la velocidad de trayectoria media (VAP), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad en línea recta (VSL); estos parámetros evalúan características de linealidad, rectitud y oscilación. Asimismo, se analiza la frecuencia de batida del flagelo (BCF) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH).

La información de las trayectorias se consigue utilizando las coordenadas del centro del espermatozoide en cada imagen examinada. El recorrido correspondiente a VCL muestra el trayecto total del espermatozoide, mientras que VSL es el movimiento entre el primer y el último punto de la trayectoria. A partir de los datos obtenidos, se calculan índices como: linealidad ($LIN = VSL/VCL$), rectitud ($STR = VSL/VAP$) y oscilación ($WOB = VAP/VCL$) para detallar mejor la calidad del movimiento espermático. Además, la BCF (frecuencia de batida del flagelo), se expresa como las veces en la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria lineal, y ALH (desplazamiento lateral de la cabeza) como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea (Valverde & Madrigal, 2018).

Morfología espermática

El análisis morfológico de los espermatozoides refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimo y glándulas accesorias de los machos. Para el análisis morfométrico se precisa de la fijación y la tinción de espermatozoides, así también la evaluación de sus diferentes elementos (acrosoma, cabeza y pieza intermedia). En la cola se puede

encontrar gotas de citoplasma, y el agrandamiento de la pieza intermedia, el cual sería un componente en la variación de los resultados obtenidos (Valverde & Madrigal, 2018).

De igual manera, para determinar la particularidad morfométrica de la cabeza (área, longitud, ancho, perímetro) y la forma (elipticidad, regularidad, rugosidad, elongación). Las morfoanomalías se producen por una espermatogénesis deficiente, genética, enfermedades, estrés, exposiciones a condiciones ambientales adversas, reposo sexual prolongado, o por técnicas inadecuadas en el manejo del semen (Valverde & Madrigal, 2018).

Las alteraciones de los espermatozoides se han catalogado en:

Alteraciones por: Morfología: cabeza, cola, sección media y presencia de gotitas citoplasmáticas (acumulación de citoplasma en el proceso de maduración del espermatozoide). Y por su origen: en las que se clasifica como causas primarias: durante el proceso de espermiogénesis que se originan en el testículo y secundarias: se producen en un post-eyaculado o en el epidídimo (Valverde & Madrigal, 2018).

Concentración espermática

Este análisis permite el conteo de espermatozoides y se define como la cantidad de células espermáticas que se encuentran por unidad de volumen en una muestra espermática. Se utilizan instrumentos como la cámara de Neubauer y Thoma. Para analizar la concentración se diluye la muestra en condiciones específicas para su análisis. Para realizar el conteo en el microscopio, se toman en cuenta las cuadrantes laterales y central en la cámara Neubauer. El resultado se lo realiza $\times 10^6$ expresado en millones, que es el número de espermatozoides por mililitro que se encuentran en la muestra espermática (Palma, 2008).

Integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal

El acrosoma es muy importante en la fecundación (Januskauskas et al., 1999). Debido a que la reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito importante en la fertilización y solo aquellos espermatozoides que realicen la reacción acrosomal (RA) de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, pasarán a través de la zona pelúcida, y, como consecuencia, fusionarse con este para formar un embrión.

Investigaciones realizadas por Fraser, (1998) demostró que en espermatozoides de ratón, sólo aquellos con acrosoma intacto son capaces de unirse a la membrana pelúcida. De igual manera,

investigaciones han evidenciado la necesidad de moléculas específicas asociadas con el ovocito para inducir la RA (Florman & Storey, 1982).

De igual manera, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal demuestra la viabilidad de espermatozoides y como la criopreservación afecta a estas estructuras ocasiona daños como: hinchazón, ruptura de las membranas, cambios de fluidez, cambios en el flujo de calcio y actividad enzimática que pueden provocar espermatozoides prematuros y afectar la fertilidad (Cabrera & Pantoja, 2012).

Por otro lado, la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) es uno de los factores necesarios para el éxito reproductivo, ya que un espermatozoide con anomalías en el material genético y que a su vez fecunde a un ovocito, este sufrirá apoptosis, cuando presente de cuatro a ocho células (Bordignon & Smith, 1999).

Entonces, el análisis de membranas es un parámetro aislado en el análisis de calidad seminal y una herramienta potencial en la predicción de fertilidad. Las técnicas empleadas por García et al., (2006), se fundamentan en la detección de rupturas en la cadena de ADN en el núcleo del espermatozoide. Esto se logra mediante el tratamiento de lisis espermática utilizando enzimas, ácidos o calor y la posterior tinción del esperma procesado.

Evaluación seminal por técnicas fluorescentes

La fluorescencia evalúa el porcentaje de células viables, se fundamenta en el análisis de espermatozoides con o sin integridad de membrana. Este método, se basa en la capacidad de la membrana plasmática para impedir la entrada de colorantes y lo cual son un indicador de la integridad estructural (Cabrera & Pantoja, 2012).

El estrés térmico que se produce durante la criopreservación del espermatozoide afecta: la membrana (plasmática, acrosomal externa y mitocondrial), provocando cambios en la fluidez, permeabilidad y composición lipídica, desencadenando daños permanentes y afectando a su supervivencia (Stornelli C., & Stornelli A, 2005).

Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia se refiere al proceso mediante el cual un espécimen absorbe y subsecuentemente irradia luz, en un intervalo de tiempo que va desde la absorción de la luz de excitación y la emisión de luz fluorescente (Von Bilderling, 2013). Este análisis de fluorescencia

evalúa el estado de las membranas de los espermatozoides y realiza pruebas de motilidad. Por otro lado, permite realizar otros análisis de tinciones fluorescentes, como los relacionados con el estado mitocondrial de la pieza intermedia. En cuanto a las técnicas de tinción fluorescente estas evalúan las características del esperma como: la integridad de la membrana, acrosoma, mitocondria, cromatina e integridad del ADN (Farah et al., 2013).

El acrosoma es una estructura de doble capa que se sitúa en la región apical de la cabeza del espermatozoide. Dentro de esta estructura se encuentran diversas enzimas, como la hialuronidasa y la acrosina. Hancock & Hovell, (1959) al evaluar el acrosoma determina que la muestra espermática debe analizarse mediante una microscopía de campo brillante o microscopía de fluorescencia.

Para la evaluación de estas estructuras existen diversas técnicas como: la microscopía de campo claro y citometría de flujo. El método para determinar el porcentaje de células viables mediante tinción, se fundamenta en la capacidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, que impide la entrada de colorantes. Por lo tanto, indica una integridad y una viabilidad celular (Valverde & Madrigal, 2018).

Para evaluar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal se emplean diversos métodos de tinción. Entre ellos, se utiliza el FITC (isotiocianato de fluoresceína) conjugado con lectinas que se unen específicamente al acrosoma. Donde el FITC-PNA tiene terminales de β -galactosa donde se van a ubicar en las membranas acrosomales externas (Silva & Gadella, 2006; Hernández et al., 2012). Otro método de tinción, es el naranja de acridina, se caracteriza por ser un colorante de ácido nucleico que se une al ADN de doble hebra helicoidal, permitiendo la medición en tiempo real de ADN y ARN, produciendo un cambio brusco en las propiedades físicas de las células (Vermes & Haanen, 1994). Además, esta tinción sirve como un indicador de viabilidad celular durante la exposición a diversos estímulos nocivos (Plemel et al., 2017). Como finalidad tenemos un marcaje de los espermatozoides, aquellos con ADN intacto se tiñen de verde, de aquellos con ADN deteriorado muestran una tinción de amarillo a naranja.

Es importante destacar, que el porcentaje de espermatozoides móviles no siempre coincide con el porcentaje de espermatozoides viables, ya que después de la preservación se ha observado que las tasas de supervivencia son mayores que las tasas de movimiento en cerdos (Johnson et al., 1996).

Materiales y Métodos

Materiales

Materiales físicos

- Hojas de bisturí N°10
- Kit de disección
- Sutura multifilamento absorbible Ácido poliglicólico N.º 2/0 longitud de 90 cm con aguja curva, medio círculo de 25 mm, punta atraumática
- Caja de poliestireno
- Guantes de inspección
- Bolsa Ziploc®
- Jeringuilla de 1ml
- Balanza electrónica de precisión (Boeco, Ref. 00101, Alemania)
- Microcentrífuga (PLC-01, Taiwán)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos (22 x 22 mm)
- Cubreobjetos largos (22 x 50 mm)
- Cámara de Neubauer (MARIENFELD, Alemania)
- Caja de criogénica de poliestireno
- Rampa doble (24 cm y 10 cm)
- Esterilizador UV
- Pajuelas de 0,25 ml (IMV, L`Aigle Cedex, Francia)
- Criotubos de 2 ml (NEST SCI, USA)
- Refrigerador
- Tanque de nitrógeno
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Tubos falcón de 10 ml
- Baño María
- Placa térmica (Ref. 12055/0010, Minitube®, Alemania)
- Vaso de precipitación de 10 ml
- Dispositivo de calentamiento (STC-3008, Ecuador)

- 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, (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v.6.4.0.9, software. Microptic S.L., Barcelona, España)

Materiales biológicos

- 20 cobayos reproductores
- 40 epidídimos de cobayo

Químicos y reactivos

- Diluyente TCG-YH al (10%YH)
- N-dimetilformamida (DMF; Fisher Scientific, Arabia Saudi)
- Glicerol
- Albúmina Sérica Bovina (BSA)
- Sacarosa (S0389, Sigma-Aldrich)
- HEPES (Fluorescence / Salt, NaCl, KOH, glucosa, agua destilada)
- Yoduro de propidio (PI, P4170, Sigma-Aldrich)
- Tinción SpermBlue (SB-250-N, España)
- Resina Sintética
- Solución fijadora (PBS o solución de Carnoy)
- Fluorocromo naranja de acridina
- Nitrógeno líquido (LN₂)
- Agua bidestilada

Métodos

Área de estudio

La recolecta de los testículos se realizó en el criadero “El Vecino” localizada en el sector San Vicente de las Caleras, en la parroquia San Sebastián de la ciudad de Cuenca en la provincia del Azuay, en las siguientes coordenadas: Latitud sur: 2°53'03.3"S y Longitud Oeste: 79°02'22.5"W, a una altitud de 2.630 m s.n.m. y a una temperatura promedio de 17 °C.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicada dentro de la granja de Irquis, en la provincia del Azuay, cantón

Cuenca, parroquia Victoria del Portete en las coordenadas: Latitud sur: 4'48.34" S y Longitud Oeste 79° 4'30.12" O; Altitud de 2671 m s.n.m.; humedad relativa del 80% y temperaturas entre 12 y 18 °C.

Diseño experimental

El presente estudio incluyó 20 pares de testículos con sus epidídimos intactos, obtenidos de 20 cobayos adultos y clínicamente sanos, recuperados por orquiectomía bilateral en 5 sesiones. En cada sesión, se recolectaron ocho testículos de cuatro cobayos y se almacenaron en bolsas plásticas identificando los testículos izquierdos y derechos de cada cobayo. La recuperación espermática se hizo por flujo retrógrado y las muestras provenientes de los testículos derechos fueron usados para la congelación convencional (CC), mientras que los izquierdos para la congelación ultrarrápida (CU), de tal manera que existieron dos tratamientos en este estudio:

1. **Congelación convencional (CC):** las muestras espermáticas derechas fueron diluidas con TCG-YH (10%), 3 % de dimetilformamida, 3 % glicerol, 1% de BSA. Un total de 80 pajuelas fueron congeladas (4 pajuelas / muestra epididimaria, n = 20).
2. **Congelación ultrarrápida (CU):** las muestras espermáticas izquierdas fueron diluidas con TCG-YH (10%), 1% de BSA, y 100 mM de sacarosa. Un total de 40 criotubos con pellets de 30 µl fueron almacenados (2 criotubos / muestra epididimaria, n= 20; ver Figura 7).

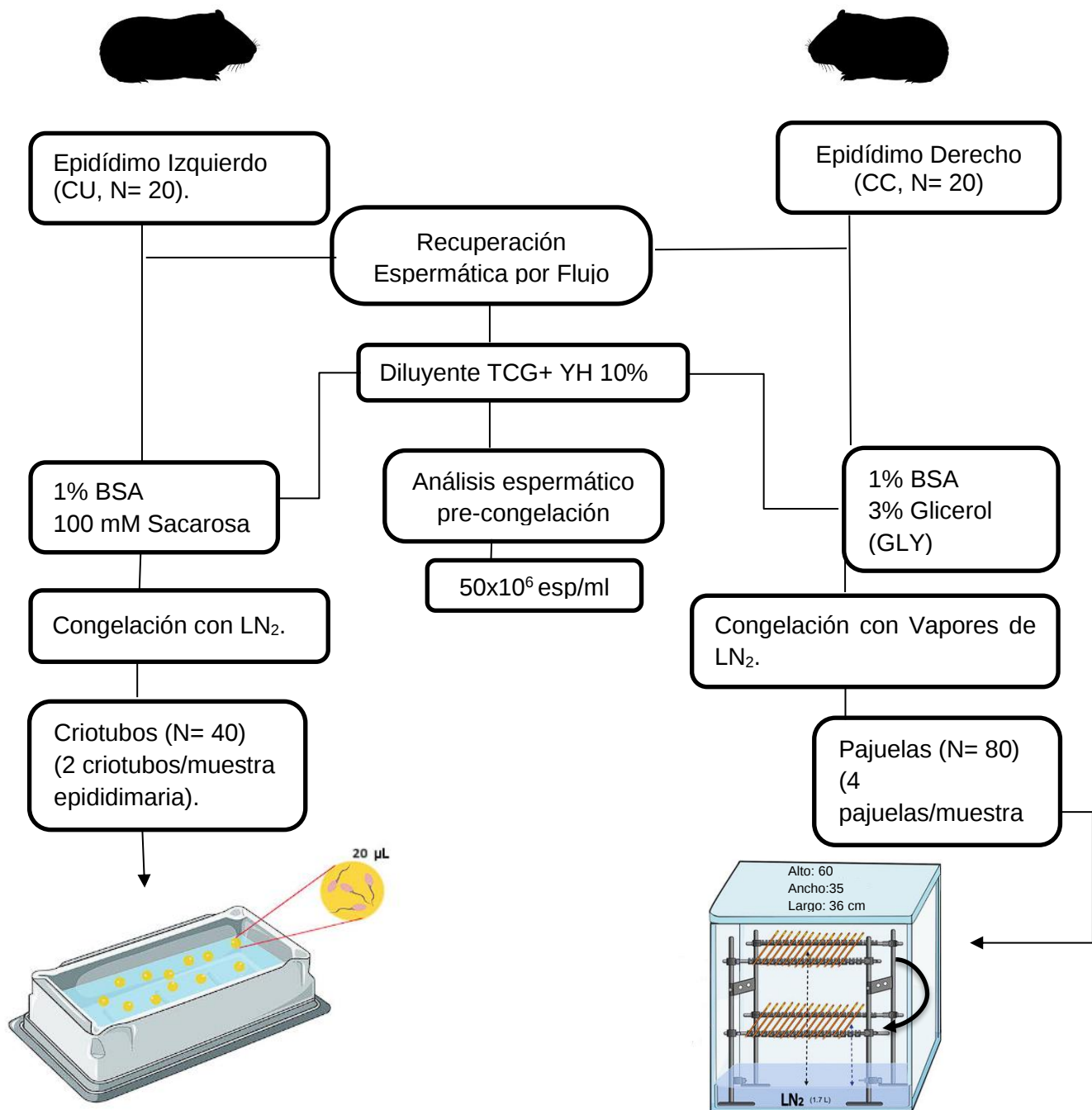


Figura 7. Diseño Experimental Fuente: Los Autores, (2024).

Preparación de Diluyentes

Los diluyentes utilizados se describen a continuación:

Tabla 1. Diluyente tris, ácido cítrico y glucosa (TCG)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Tris</i>	11,4 g
<i>Ácido cítrico</i>	6,6 g
<i>Glucosa</i>	1,8 g
<i>Penicilina</i>	240 mg
<i>Estreptomicina</i>	300 mg
<i>Agua milli-Q</i>	300 ml
<i>pH 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mOsmol/kg</i>	

Tabla 2. Medio HEPES para epifluorescencia

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Hepes Salt</i>	476,62 mg
<i>NaCl</i>	1151,27 mg
<i>KOH</i>	16,5 mg
<i>Glucosa</i>	198,77 mg
<i>Agua milli Q</i>	100ml

Tabla 3. Yoduro de propidio (PI)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
<i>Yoduro de propidio</i>	1 mg
<i>PBS</i>	1 ml

Tabla 4. Aglutinina (PNA-FITC)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>

<i>PNA-FITC aglutinina</i>	0,2 mg
<i>BSA</i>	5 mg
<i>PBS</i>	1 ml

Tabla 5. Buffer de estabilización

Reactivo	Cantidad
<i>Ácido Cítrico</i>	3,07 g
<i>Na₂HPO₄</i>	425,88 g

Tabla 6. Tinción fluorescente simultánea para evaluación de la membrana plasmática y acrosomal

Reactivo	Cantidad
<i>Yoduro de Propidio (PI)</i>	50 µl
<i>PNA-FITC</i>	50 µl

Tabla 7. Materiales para la recuperación espermática

Físicos	Químicos
<i>Bisturí</i>	TCG-YH 10%
<i>Caja Petri</i>	
<i>Tubo Eppendorf</i>	
<i>Aguja Fina</i>	
<i>Papel Secante</i>	

Recolección testículos y muestras espermáticas

Los testículos de los cobayos usados para esta investigación fueron obtenidos del criadero “El Vecino” localizada en el sector San Vicente de las Caleras, en la parroquia San Sebastián de la ciudad de Cuenca en la provincia del Azuay. Un total de 40 testículos (20 izquierdos y 20 derechos) fueron colectados mediante orquiectomía bilateral de 20 cobayos adultos y

clínicamente sanos. El proceso quirúrgico se realizó siguiendo el procedimiento detallado por Galarza et al., (2023). Los testículos izquierdos y derechos de cada cobayo, fueron almacenados a temperatura ambiente (22°C) en bolsas plásticas con cierre hermético (Ziploc). Estas muestras biológicas fueron debidamente identificadas y transportadas al Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal en un tiempo inferior a 1 hora post-cirugía.

En el laboratorio, a temperatura ambiente (22°C), se realizó la recuperación de espermatozoides epididimarios mediante la técnica de flujo retrógrado (Galarza et al., 2023). Brevemente, los testículos derechos e izquierdos fueron lavados con suero fisiológico, limpiados y separados sus epidídimos de sus testículos. El flujo retrógrado consistió administrar 1 ml diluyente TCG-YH (yema de huevo al 10%) por el conducto deferente con ayuda de una jeringa de 1 ml con aguja fina de 0,5 x 16 mm recortada la punta (sin filo), una vez dilatada la cola del epidídimo se realizaron cortes longitudinales por donde fluyó una sustancia lechosa y blanquecina. Este líquido fue recibido en una caja de búsqueda estéril y luego recuperada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Cada muestra epididimaria proveniente de los testículos izquierdos y derechos fue evaluada en el sistema CASA donde inicialmente se analizó la cinética espermática.

Los testículos derechos fueron usados para la congelación convencional (CC, n = 20 muestras) y los testículos izquierdos para la congelación ultrarrápida (CU, n = 20 muestras). Por consiguiente, la concentración espermática de cada muestra epididimaria izquierda o derecha fue evaluada por conteo celular usando una cámara de Neubauer. Para ello, se preparó previamente una dilución 1:200 (3 µl de muestra espermática en 600 µl de solución formulada) y de aquella dilución se tomó 10µl para el conteo en la cámara de Neubauer.

Congelación convencional (CC)

Las muestras espermáticas provenientes de los testículos derechos fueron usadas para congelar convencionalmente las muestras epididimarias mediante vapores de nitrógeno líquido estático. Cada muestra fue ajustada a una concentración de 100×10^6 esp/ml usando el mismo diluyente TCG-YH al 10% suplementado con 6% de glicerol (GLY) + 6% de dimetilformamida (DMF) + 2% de albúmina sérica bovina (BSA). Con esta mezcla, se aseguró que la concentración final de espermatozoides fuera de 50×10^6 esp/ml, 3% GLY, 3% DMF y 1% BSA. Las muestras fueron refrigeradas a 5°C durante 2 horas previo a la congelación. Treinta minutos antes de la congelación, las muestras fueron cargadas en pajuelas de 0,25 ml debidamente rotuladas y esterilizadas.

La congelación se realizó exponiendo las pajuelas a vapores de LN₂ estático. Para esto, se usó una caja criogénica de poliestireno (60 cm de largo x 35 cm de ancho x 36 cm de alto) que en su interior contenía un sistema de doble rampa a una altura de 35 cm la primera rampa y 12 cm la segunda rampa. Previo a la congelación, se colocaron 1,7 litros de LN₂ en la caja criogénica equivalente a 2 cm de altura y las pajuelas fueron colocadas en la primera rampa 1 minuto, y luego fueron bajadas a la segunda rampa durante 2 minutos más. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas en LN₂ alcanzando una temperatura de -196 °C. Se congelaron un total 80 pajuelas (4 pajuelas / muestra epididimaria).

La descongelación se realizó sumergiendo las pajuelas en Baño María a 37°C durante 30 segundos. El contenido espermático fue recolectado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y puesto a incubación durante 5 minutos previo a su análisis.

Congelación ultrarrápida (CU)

Las muestras espermáticas provenientes de los testículos izquierdos se usaron para congelar ultrarrápidamente sumergiendo directamente las muestras en LN₂. Cada muestra espermática fue ajustada a una concentración inicial de 100×10^6 esp/ml usando el mismo diluyente TCG-YH al 10% suplementado con 200 mM de sacarosa + 2% de albúmina sérica bovina (BSA). Con esta mezcla, se aseguró que la concentración final de espermatozoides fuera de 50×10^6 esp/ml, 100 mM sacarosa y 1% BSA. Las muestras fueron refrigeradas a 5°C durante 30 minutos previo a la congelación.

Previo a la CU, se colocó LN₂ en una caja de poliestireno (40 cm de largo, 29 cm de ancho, 13 cm de alto). Con la ayuda de una pipeta de 1000 µL se dejó caer directamente sobre el nitrógeno líquido gotas de 20 µL de muestra espermática a una altura de 15 cm, y los pellets formados se almacenaron en criotubos de 2 ml dentro de un tanque criogénico a -196 °C. Un total de 40 criotubos (2 criotubos / muestra epididimaria) fueron almacenados.

La descongelación de los pellets se realizó en un dispositivo STC-3008 ajustado a una temperatura de 65°C. Los pellets se deslizaron sobre la platina térmica durante 3 segundos y el contenido derretido se recolectó en un vaso de precipitación de 10 ml, y consecuentemente, se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Inmediatamente, las muestras descongeladas fueron centrifugadas a 300 gravedades durante 5 minutos; el sobrenadante fue eliminado y el sedimento

fue resuspendido con en el diluyente de TCG-YH al 10% e incubado durante 5 minutos a 37°C para los análisis posteriores.

Análisis de calidad espermática

Cinemática espermática

La cinemática de las muestras de espermatozoides, tanto frescas como descongeladas, fue evaluada por medio del sistema computarizado CASA-SCA[®]. Para ello, se tomaron 5 µl de cada muestra y se colocaron portaobjetos junto con su cubreobjetos, previamente atemperados a 37°C. El sistema CASA estaba acoplado a un microscopio de contraste de fases y registro los siguientes parámetros:

- Motilidad total (MT, %): porcentaje de espermatozoides móviles.
- Motilidad progresiva (MP, %): porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.
- Velocidad curvilínea (VCL, µm/s): Velocidad total del espermatozoide a lo largo de su trayectoria.
- Velocidad promedio (VAP, µm/s): velocidad promedio del espermatozoide.
- Velocidad rectilínea (VSL, µm/s): velocidad en línea recta del espermatozoide.
- Linealidad (LIN, %): proporción entre VSL y VCL, indicado la rectitud del movimiento.
- Rectitud (STR, %): Porcentaje de espermatozoides con movimiento recto.
- Oscilación (WOB, %): Amplitud de oscilación del espermatozoide.
- Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm): Medida de la oscilación lateral de la cabeza del espermatozoide.
- Frecuencia de batida del flagelo (Hz): Numero de oscilaciones del flagelo por segundo.

Estos parámetros se evaluaron en 3 campos de cada muestra, con 200 trayectos de espermatozoides en promedio por cada replica de los distintos tratamientos. Después, se realizó una limpieza manual de los campos capturados.

Estado de las membranas espermáticas

La evaluación del estado de las membranas espermáticas se realizó mediante microscopía de epifluorescencia usando la doble tinción simultánea de fluorocromos “IP (ioduro de propidio) + FITC/PNA (aglutinina)”. Para ello, se preparó la tinción mezclando 50 µl de IP con 50 µl de FITC/PNA aglutinina, en condiciones de oscuridad. Las muestras espermáticas fueron diluidas

con solución HEPES ajustado a una concentración de 20×10^6 esp/ml, y a esta mezcla se agregó 5 μ l de la doble tinción fluorescente IP + FITC/PNA bajo las condiciones de oscuridad. Se analizaron cuatro subpoblaciones espermáticas mediante el conteo celular (al menos 100 espermatozoides) en un microscopio de epifluorescencia (excitación: 450-490 nm y emisión: 520 nm), siguiendo el protocolo de Galarza et al., (2023). Las subpoblaciones evaluadas fueron las siguientes:

- IPIA: Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto.
- IPDA: Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado.
- DPIA: Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto.
- DPDA: Membrana plasmática dañada y acrosoma dañado.

Además, se calculó el porcentaje total de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (total IP: IPIA + IPDA) y el porcentaje total de espermatozoides con acrosoma íntegro (total IA: IPIA + DPIA).

Evaluación de morfometría de la cabeza de los espermatozoides

Cada frotis fue realizado mezclando 5 μ l muestra fresca o descongelada y 8 μ l de SpermBlue en el extremo del portaobjetos, estas sustancias se homogeneizaron y se expandieron con otro portaobjetos. Los frotis fueron puestos en la placa térmica para secarse y ser fijados con cubreobjetos largos utilizando resina sintética. La técnica la describió previamente Galarza et al., (2021).

Posteriormente, se realizó un análisis automático de morfometría de las cabezas de los espermatozoides utilizando el módulo ASMA (*Automated Sperm Morphology Analysis*) del sistema CASA (SCA). Tanto las muestras frescas como las criopreservadas con los dos procedimientos (CC y CU) se analizaron examinando 100 imágenes de cabeza teñidas a un aumento de 40X para obtener dimensiones morfométricas: Largo (L, μ m), Ancho (W, μ m), Área (A, μ m²), perímetro (P, μ m), Elipticidad (L/W, μ m), Elongación ((L-W) / (LmasW), μ m), Rugosidad ($4\pi A/P^2$, μ m) y Regularidad ($\pi LW/4A$, μ m) de los espermatozoides.

Evaluación de la integridad de ADN

Para la evaluación de la integridad de ADN se usó la tinción fluorescente con naranja de acridina. Esta prueba evaluó la estabilidad de la cromatina siendo equivalente a la integridad del ADN,

según lo detallado por Martins et al., (2007). Se tomaron 10 µl de muestra y se preparó un frotis en un portaobjeto, que se dejó secar en la placa térmica, después se fijó durante 1 hora en la solución fijadora de Carnoy (PBS y ácido acético glacial en proporción 3:1). Posteriormente se sacó de la solución y se dejó secar al aire para ser sumergidos en una solución tampón (80 nmol/l de ácido cítrico y 15 nmol/l de Na_2HPO_4 , pH 2,5) y llevados a la incubadora a 75 °C durante 5 minutos para probar la estabilidad de la cromatina. A continuación, cada placa se sacó de la solución tampón y se tiñó con fluorocromo naranja de acridina (0,2 mg/ml) durante 1 minuto y se lavó con agua bidestilada 1 o 2 veces por 2 segundos. En la humedad se colocó un cubreobjeto largo y se evaluó con un microscopio de epifluorescencia (excitación: 490/530 nm). Se analizaron 100 células espermáticas en cada portaobjetos de tratamiento. Para obtener los resultados los espermatozoides con contenido normal de ADN presentaron fluorescencia verde, y los que tengan ADN anormal emitieron fluorescencia en un espectro entre amarillo verdoso al rojo naranja. El porcentaje total de cromatina intacta se calculó dividiendo el número de espermatozoides teñidos de verde entre el número total de espermatozoides, multiplicado por 100.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en esta investigación fueron analizados en el software STATISTICA versión 12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Los resultados están presentados como promedio $\pm$ error estándar de la media (EEM). Previo a los análisis estadísticos se comprobó la distribución normal de los datos en cada variable paramétrica (de salida) usando la prueba de Shapiro Wilk; aquellas variables que no cumplieron la distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* o *Log-10* (porcentuales y numéricos, respectivamente). Para comprobar el análisis de las varianzas se usó la prueba de Levene. Un ANOVA factorial fue usado para evaluar la interacción entre el '*método de criopreservación* (CC y CU) $\times$ *tipo de muestra espermática* (pre-congelación y post-descongelación) en los parámetros cinemáticos y morfometría de la cabeza. Cuando se comprobó diferencias significativas entre tratamientos, se usó la prueba posHoc de Bonferroni sobre la cinemática, integridad de membranas y dimensiones de cabeza. Para analizar las diferencias significativas entre métodos de criopreservación en muestras post-descongeladas para integridad de membranas y de ADN se usó un ANOVA de una vía. El nivel de significancia usado en este estudio fue $P < 0,05$.

Resultados

Cinemática espermática

Los resultados de la cinemática de los espermatozoides de cobayo antes (*pre-congelación*) y después de la descongelación (*post-descongelación*) se muestran en las **Figuras 8 – 12**. Una interacción significativa entre el *método de criopreservación* × *tipo de muestra espermática* fue observada en la motilidad total (MT) y la VSL con trayectoria progresivamente rápida.

En general, todos los parámetros cinemáticos fueron afectados por la criopreservación, independientemente del método usado, debido a la reducción drástica ($P < 0,01$) de sus valores post-descongelación en comparación con sus valores pre-congelación.

En el análisis de las muestras espermáticas previo a la congelación, la muestra de congelación CU mostraron una MT significativamente mayor ($P < 0,05$) que la muestra de congelación convencional. Posterior a la descongelación, las muestras congeladas ultrarrápidamente produjeron porcentajes más altos ($P < 0,05$) de MT y MP que aquellas muestras congeladas convencionalmente (**Figura 8**).

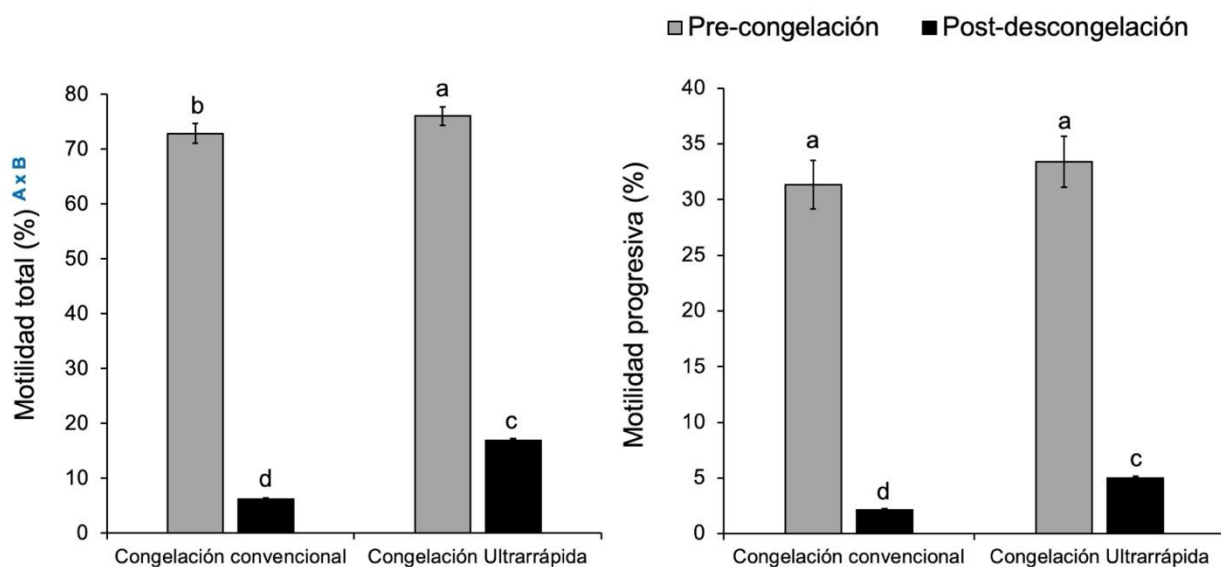


Figura 8. Motilidad total y progresiva de espermatozoides de cobayos, ya sea frescos, o criopreservados por congelación convencional lenta y ultrarrápida. **A x B** Interacción significativa entre '*método de criopreservación* × *tipo de muestra espermática*' ($P < 0.001$). Letras diferentes

en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos $a-b-c-d$, $P < 0,05$; $a-c-d$, $P < 0,01$; $a-d$, $P < 0,001$.

Al analizar las velocidades espermáticas, los valores de VCL, VAP y VSL de las muestras espermáticas post-descongelación fueron significativamente menores que los valores de las muestras pre-congelación ($P < 0,05$). No se evidenciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los métodos de criopreservación en ningún parámetro de velocidad, tanto en las muestras pre-congelación como en las post-descongelaciones (**Figura 9**).

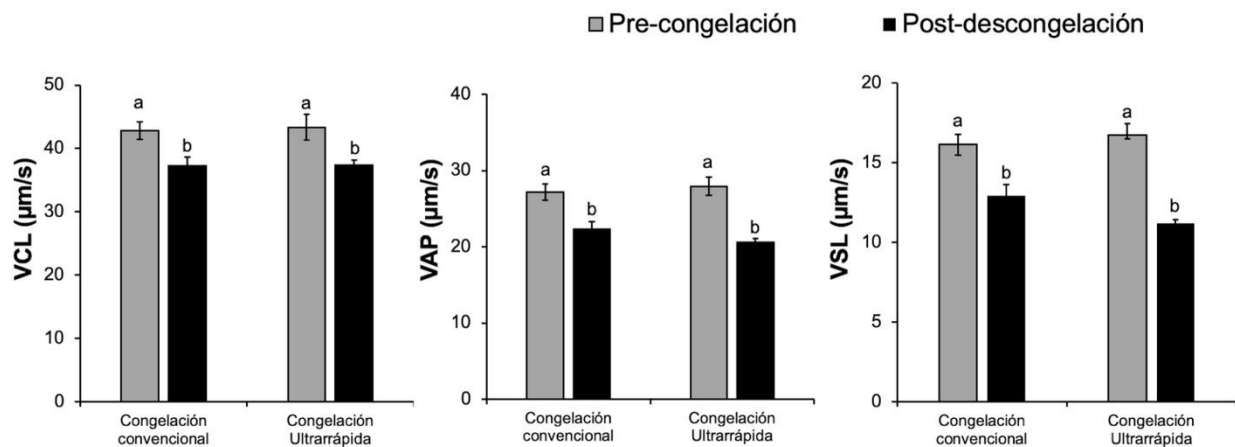


Figura 9. Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de espermatozoides de cobayos, ya sea frescos, o criopreservados por congelación convencional lenta y ultrarrápida. Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos $a-b$, $P < 0,05$.

Eficientemente, aquellas muestras criopreservadas mediante congelación ultrarrápida produjeron valores más altos ($P < 0,05$) de VCL y VSL progresiva rápida que aquellas muestras criopreservadas mediante congelación convencional (**Figura 10**).

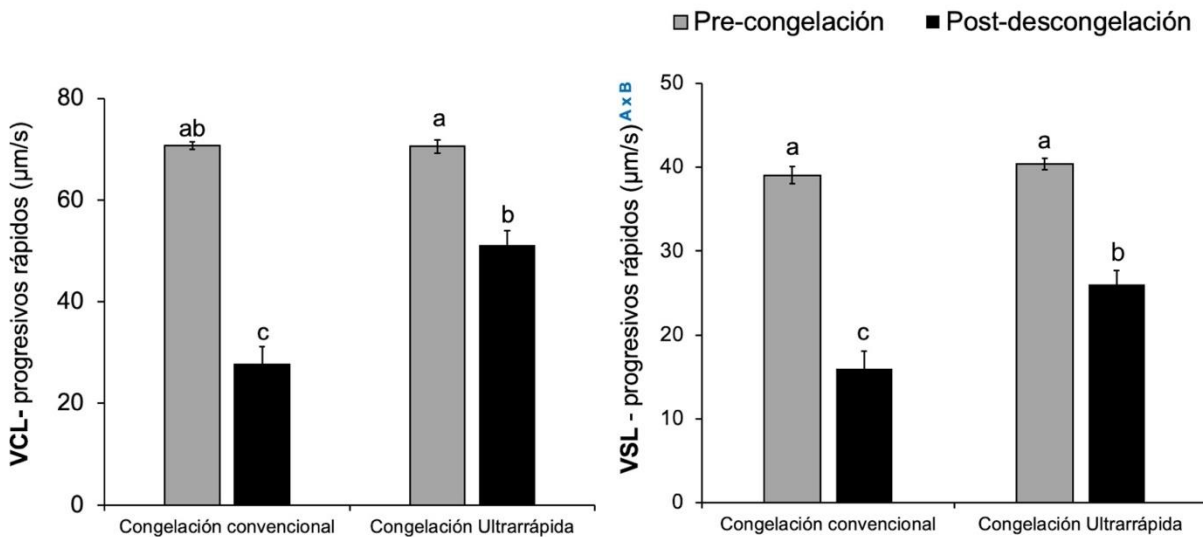


Figura 10. Velocidades curvilínea y rectilínea con trayectoria progresivamente rápida, de espermatozoides de cobayos, ya sea frescos, o criopreservados por congelación convencional lenta y ultrarrápida. ^{A x B} Interacción significativa entre 'método de criopreservación × tipo de muestra espermática' ($P < 0.001$). ^{a - b - c} Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos ^{a-b}, $P < 0,05$; ^{a-c}, $P < 0,01$.

No se evidenciaron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) entre métodos de criopreservación ni entre muestras pre-congelación y post-descongelación. En la congelación ultrarrápida, el porcentaje de LIN pre-congelación se redujo significativamente ($P < 0,05$) después de la descongelación. Asimismo, tanto en la congelación convencional como en la ultrarrápida, los porcentajes de WOB se redujeron significativamente después de la descongelación ($P < 0,05$; **Figura 11**).

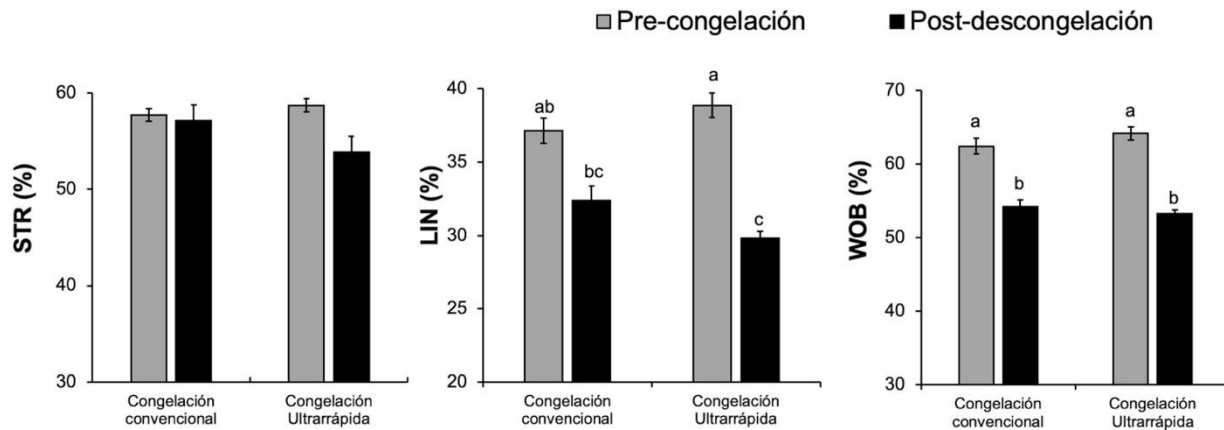


Figura 11. Parámetros de relación de progresión como la rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de espermatozoides de cobayos, ya sea frescos, o criopreservados por congelación convencional lenta y ultrarrápida. ^{a-c} Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos ^{a-b-c}, $P < 0,05$, ^{a-c}, $P < 0,05$

En la congelación convencional, el valor de ALH se redujo significativamente ($P < 0,05$) después de la descongelación. Eficientemente, las muestras criopreservadas mediante congelación ultrarrápida produjo valores de ALH más altos ($P < 0,05$) que aquellas muestras congeladas convencionalmente. Por otro lado, los valores de BCF disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) después de ambos métodos de criopreservación. No se evidenció diferencias significativamente ($P > 0,05$) entre los métodos de congelación en muestras pre-congelación y post-descongelación (Figura 12).

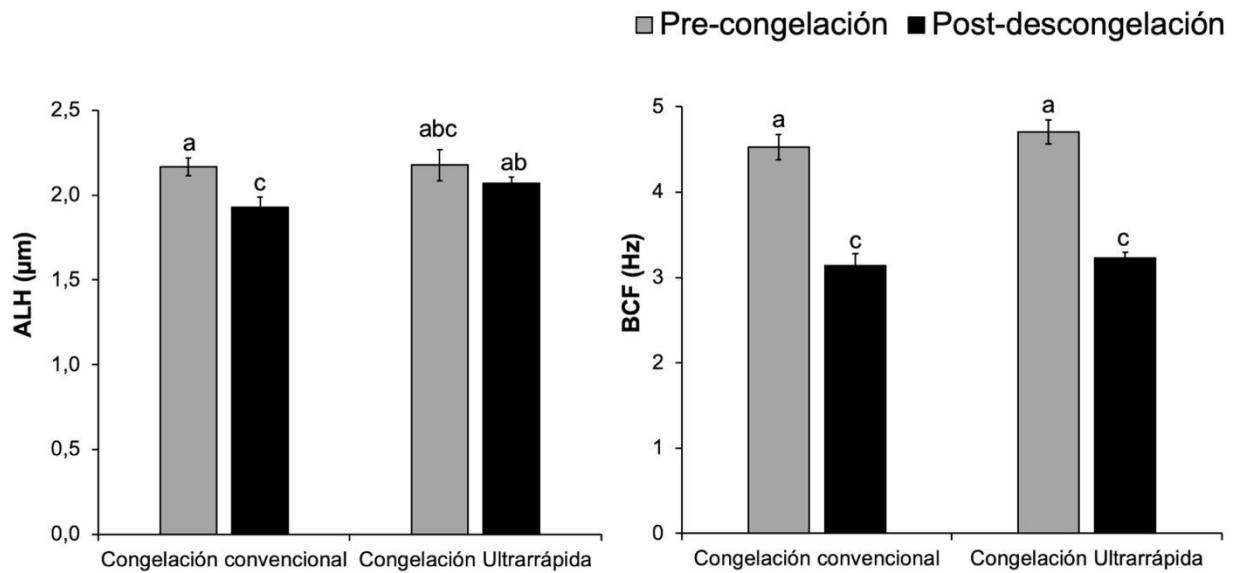


Figura 12. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides de cobayos, ya sea frescos, o criopreservados por congelación convencional lenta y ultrarrápida. ^{a-c} Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos ^{a-b-c}, $P < 0,05$, ^{a-c}, $P < 0,05$.

Integridad de membranas

El estado de las membranas plasmática y acrosomal en espermatozoides de cobayo congelados y descongelados en sus diversas categorías se muestran en la **Figura 13**. El análisis de las muestras criopreservadas evidenció que aquellos espermatozoides de cobayo congelados ultrarrápidamente presentaron mayores porcentajes ($P < 0,05$) de espermatozoides vivos con acrosoma intacto que aquellos espermatozoides congelados convencionalmente. En este mismo sentido, la congelación ultrarrápida presentó un menor porcentaje ($P < 0,05$) de espermatozoides muertos con acrosoma dañado que la congelación convencional (**Tabla 7**).

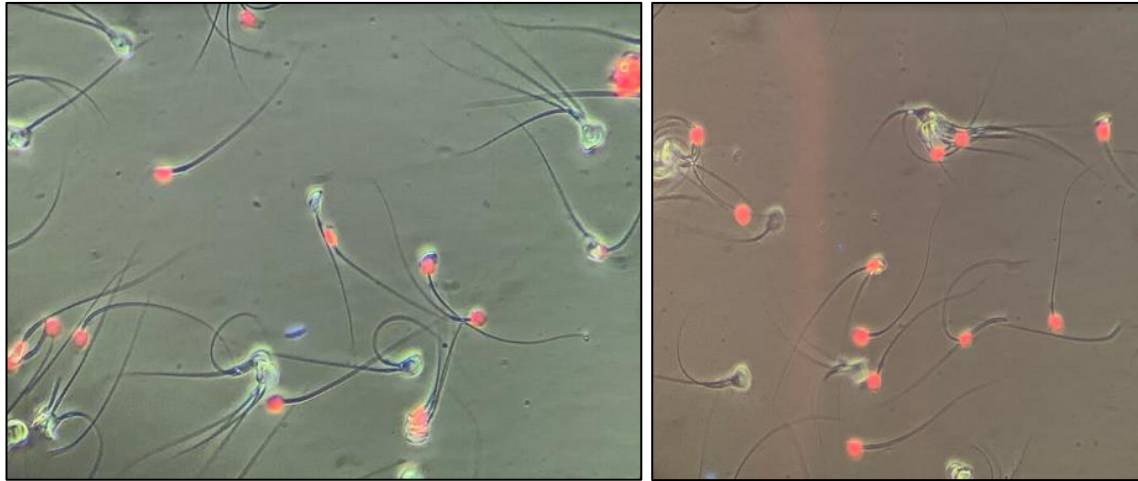


Figura 13. Evaluación de la integridad de membranas de los espermatozoides de cobayo utilizando la prueba de doble tinción con fluorescencia IP + FITC/PNA. Fuente: Los Autores

Tabla 7. Estado de las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides de cobayo criopreservados mediante congelación convencional lenta y ultrarrápida.

Categorías de espermatozoides según la fluorescencia	Método de criopreservación	
	CC (n=120)	CU (n=120)
Espermatozoides vivos/acrosoma intacto (IPIA, %)	8,2 ± 0,16 ^b	19,2 ± 0,28 ^a
Espermatozoides vivos/acrosoma dañado (IPDA, %)	0,15 ± 0,03	0,21 ± 0,04
Espermatozoides muertos/acrosoma intacto (DPIA, %)	20,4 ± 0,58	20,4 ± 0,40
Espermatozoides muertos/acrosoma dañado (DPDA, %)	71,2 ± 0,64 ^b	60,2 ± 0,51 ^a
Total de espermatozoides vivos (%)	8,4 ± 0,17 ^b	19,4 ± 0,28 ^a
Total de espermatozoides con acrosoma intacto (%)	28,7 ± 0,63 ^b	39,6 ± 0,51 ^a

Diferentes superíndices en cada fila expresan diferencias significativas entre métodos de congelación a – b, $P < 0,0001$.

Integridad del ADN

La integridad y daño de ADN en espermatozoides de cobayo congelados y descongelados se muestran en la **Figura 14**. El análisis de integridad de ADN, equivalente a la integridad de la

cromatina en muestras criopreservadas evidenció que aquellos espermatozoides de cobayo congelados ultrarrápidamente presentaron un mayor porcentaje ($P < 0,05$) de espermatozoides con la cromatina íntegra, que aquellos espermatozoides congelados convencionalmente.

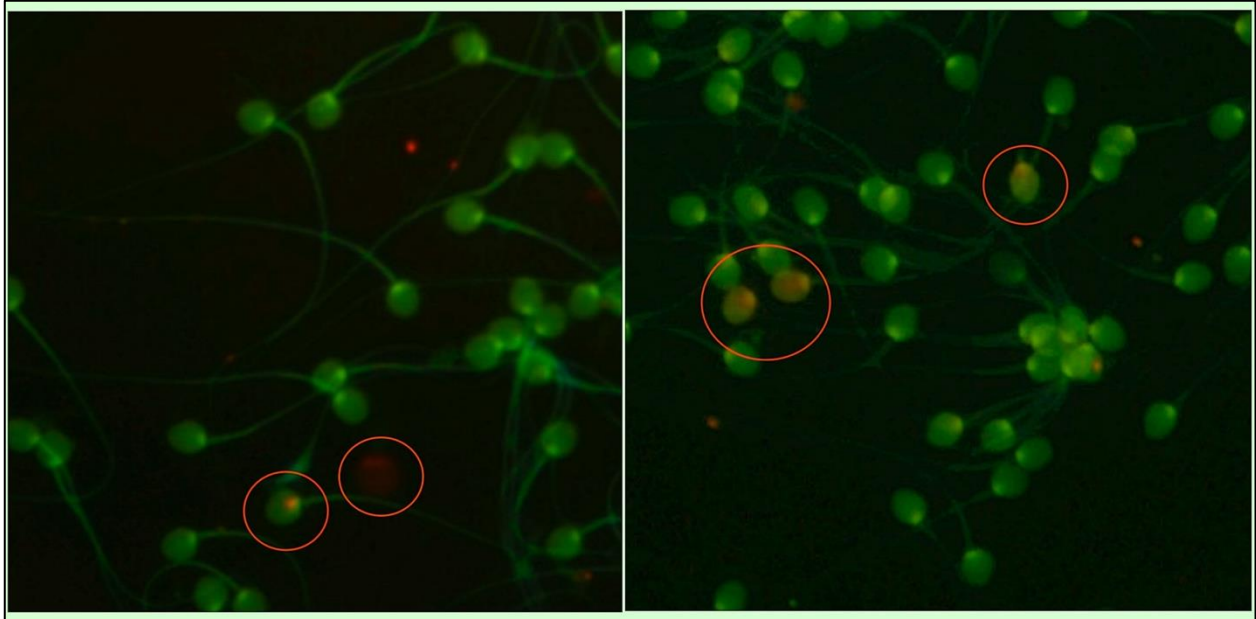


Figura 14. Análisis de la integridad de la cromatina en los espermatozoides del cobayo utilizando el fluorocromo naranja de acridina. El colorante emite luz verde cuando tiñe el ADN intacto y luz naranja cuando se une al ARN o comportamientos ácidos.

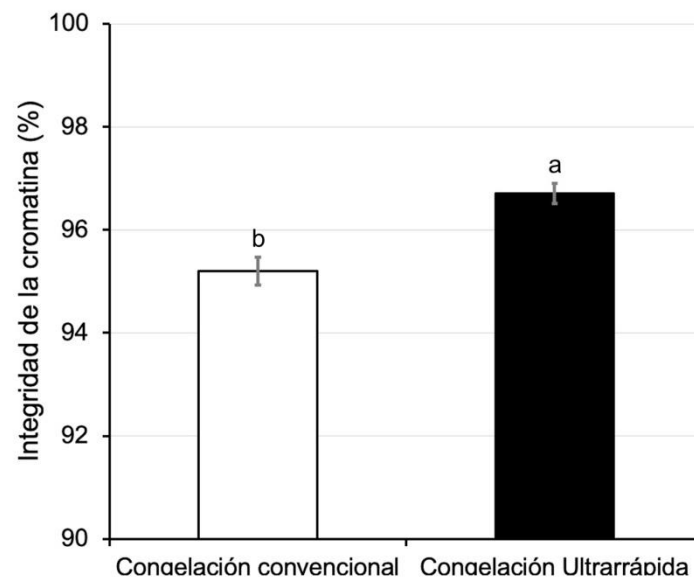


Figura 15. Integridad de ADN (equivalente a la integridad de la cromatina) de espermatozoides de cobayo criopreservados mediante congelación convencional lenta y ultrarrápida. Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos ($a-b$, $P < 0,0001$).

Morfometría de la cabeza de espermatozoides de cobayo.

La tinción y trayectos medidos por el sistema CASA-ASMA de la cabeza de los espermatozoides de cobayo, frescos y criopreservados, se muestran en la **Figura 15**. La comparación de la morfometría (Longitud vs. Área) de la cabeza del espermatozoide epididimario de cobayo antes y después de la congelación convencional y ultrarrápida, se muestran en la **Figura 16**. El análisis de las dimensiones morfométricas de la cabeza de los espermatozoides epididimarios se muestra en la **Tabla 12**.

Los resultados mostraron que las dimensiones y forma de la cabeza no se vieron alterados por ningún método de criopreservación en comparación con los valores previos a la congelación. Es decir, que la longitud, anchura, área y perímetro no se redujeron o aumentaron ($P > 0,05$) después de la congelación convencional o ultrarrápida (**Tabla 12**).

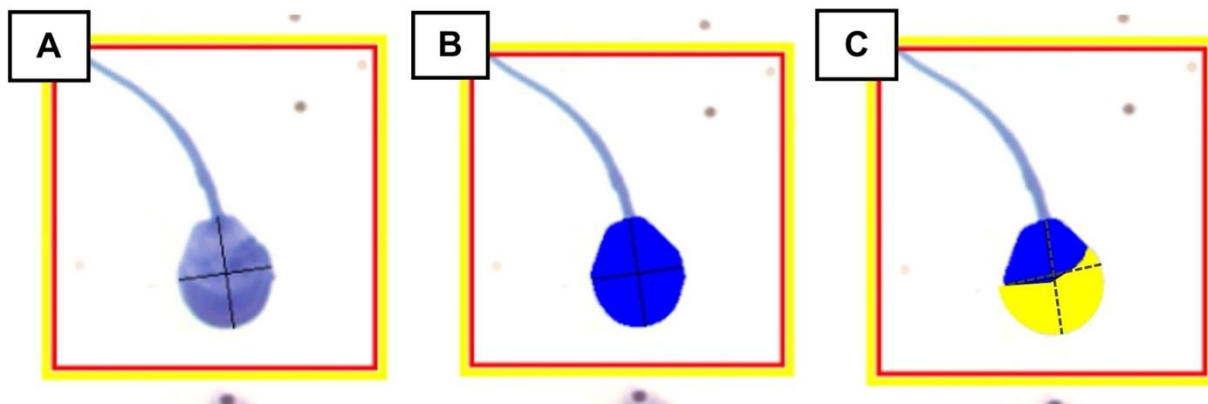


Figura 15. Análisis de espermatozoide de cobayo teñido con SpermBlue utilizando el módulo ASMA (Análisis automatizado de morfometría de espermatozoides) del sistema automatizado CASA-SCA®. En la imagen A, se muestra un espermatozoide teñido con su longitud y anchura; En la imagen B, se miden el área y perímetro de la cabeza (azul); y Finalmente, en la imagen C, se destaca el marcaje del acrosoma (amarillo). Fuente: Los Autores, (2024).

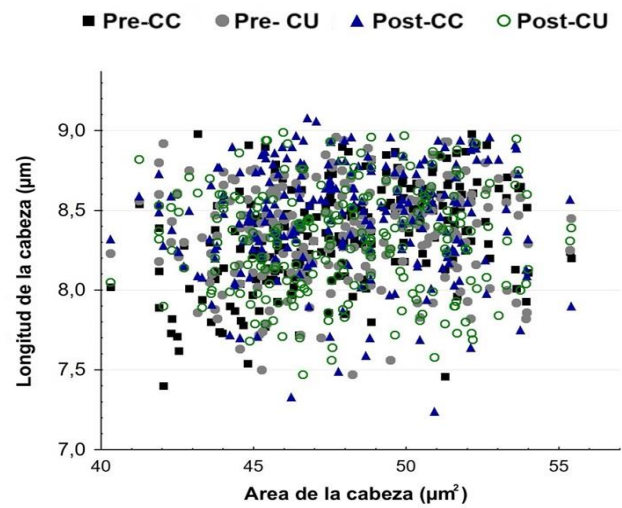


Figura 16. Comparación de la morfometría de la cabeza del espermatozoide epididimario de cobayo antes y después de la congelación convencional y ultrarrápida. Los datos corresponden a la relación entre el área de la cabeza del espermatozoide (μm^2) y la longitud (μm), medida en 300 espermatozoides de cada tratamiento. Fuente: Los Autores, (2024).

Tabla 12. Dimensiones morfométricas de la cabeza de espermatozoides de cobayos, tanto frescos, como criopreservados mediante congelación convencional lenta y ultrarrápida.

Dimensiones de la cabeza	Muestras pre-congelamiento		Muestras post-descongelamiento	
	Tratamientos		Tratamientos	
	CC	CU	CC	CU
Longitud (μm)	8,45 $\pm$ 0,43	8,40 $\pm$ 0,38	8,47 $\pm$ 0,28	8,41 $\pm$ 0,21
Anchura (μm)	7,06 $\pm$ 0,40	7,10 $\pm$ 0,39	7,01 $\pm$ 0,12	7,01 $\pm$ 0,13
Área (μm^2)	50,16 $\pm$ 1,47	50,20 $\pm$ 1,31	49,96 $\pm$ 1,69	49,87 $\pm$ 1,41
Perímetro (μm)	22,23 $\pm$ 1,02	22,20 $\pm$ 0,95	22,06 $\pm$ 0,50	21,93 $\pm$ 0,39
Elípticidad	1,2 $\pm$ 0,10	1,20 $\pm$ 0,08	1,21 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,03
Elongación	0,09 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
Rugosidad	1,28 $\pm$ 0,12	1,30 $\pm$ 0,09	1,29 $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,02
Regularidad	0,94 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01

Letras diferentes en barra expresan diferencias significativas entre tratamientos ^{a-b-c-d}, $P < 0,05$; ^{a-c-d}, $P < 0,01$; ^{a-d}, $P < 0,001$.

Discusión

Los hallazgos de este estudio demostraron que la congelación ultrarrápida de espermatozoides epididimarios de cobayo al utilizar diluyente el TCG-YH al 10%, suplementado con los agentes crioprotectores como la BSA y sacarosa, sumergidos directamente en LN₂ en gotas de 20 µl, produjeron mayor crioresistencia basada en una mayor cinemática e integridad de membranas y ADN, en comparación con la congelación convencional que empleó vapores de LN₂ estático. Aunque, los valores de motilidad e integridad de membranas se redujeron drásticamente después de la congelación con ambos métodos (pre-congelación 70 al 80% vs. post-descongelación 8 al 19%), la congelación ultrarrápida resultó más efectiva para criopreservar los espermatozoides de esta especie. Estudios recientes realizados en cobayos también demostraron una reducción significativa de la motilidad posterior a la criopreservación documentado por Galarza et al., (2023) con valores del $11,2 \pm 1,41\%$, y Calderón & Pintado (2023) demostrando el $4,4 \pm 0,8\%$.

Un estudio realizado por O'Brien et al., (2019), observó una disminución en la crioresistencia espermática con el uso del protocolo de CU en el delfín, bisonte europeo, y oso koala. Este último tiene similitud en la forma del espermatozoide del cobayo y también mostró una reducción en la calidad espermática, similar a lo encontrado en el presente estudio.

En trabajos previos realizados por Machuca, (2021) y Calderón & Pintado, (2023) se evidenció que la criosupervivencia de espermatozoides de cobayo fue muy baja (inferior al 20%). Entonces se plantea como hipótesis principal, que las grandes dimensiones de la cabeza del espermatozoide de cobayo (Longitud: $8,45 \pm 0,43 \mu\text{m}$; y Área: $50,16 \pm 1,47 \mu\text{m}^2$) puede ser un factor crucial para criosupervivencia, pues esto ha sido demostrado en otras especies de mamíferos silvestres como el koala (Longitud: $7,3 \pm 1,3$; y Área: $23,92 \pm 0,647 \mu\text{m}^2$) y la gacela dama (Longitud: $9,458 \pm 0,041 \mu\text{m}$; y Área: $43,746 \pm 0,291 \mu\text{m}^2$; Gravance et al., 1998; O'Brien et al., 2019).

Yániz et al., (2015) han propuesto que las variaciones entre la forma de la cabeza de los espermatozoides y el área pueden ser responsables de las variaciones en la velocidad del flujo y reflujo de agua y el crioprotector a través de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación.

En consecuencia, se sugiere que la variación en el daño causado por un método de congelación en específico podría estar relacionada con las dimensiones de la cabeza del espermatozoide.

Los resultados de nuestro estudio indican que la congelación convencional provocó mayor daño a la membrana plasmática, posiblemente debido a una deshidratación inadecuada y una rápida nucleación de hielo durante el rango crítico de temperatura de congelación (-5 y -25°C). Anteriormente, Galarza et al., (2023) evidenció que la nucleación de hielo en la congelación convencional de espermatozoides de cobayo ocurrió a -11,2 °C después de 11 segundos de exposición a los vapores de LN₂ con el uso de dos diluyentes TCG al 20% YH y TCF (Tris, ácido cítrico y D-fructuosa). Además, la alta osmolaridad del medio de congelación convencional (1268 mOsm/kg) podrían generar un estrés osmótico (daño mecánico) en la membrana plasmática, lo que posiblemente contribuyó a una ineficiente deshidratación celular.

Otro factor relevante a considerar es la concentración de colesterol y fosfolípidos en las membranas espermáticas, que protegen al espermatozoide contra el choque de frío. En especies silvestres, como la gacela dama, se ha observado que las membranas espermáticas tienen una mayor proporción de colesterol y fosfolípidos lo que podría conferirles una mayor crioresistencia al frío (White. 1993; Meyers, 2005). Sin embargo, Aksoy et al., (2010), comprobaron que la adición de colesterol al medio de congelación proporciona cierta crioprotección a las membranas espermáticas con efectos tales como el mejoramiento de la funcionalidad y la respuesta a medios osmóticos, así como la reducción de la reacción acrosomal. Por lo tanto, conocer el contenido de colesterol en las membranas plasmáticas de espermatozoides de cobayo podrían proporcionar información valiosa para realizar una criopreservación exitosa.

Se postula que la velocidad de enfriamiento óptima es fundamental para minimizar el daño criogénico y lograr mayor viabilidad de los espermatozoides al descongelarse (Purdy, 2006). Esto genera una mejor deshidratación y rehidratación de los espermatozoides de cobayo durante la congelación y descongelación, respectivamente. Sin embargo, en este trabajo investigativo esto no se pudo evidenciar. Se ha detallado previamente que las altas velocidades de enfriamiento pueden provocar daños letales en las células como el choque de frío, la formación hielo intracelular, daño mecánico y especies reactivas de oxígeno lo que reduce la supervivencia de espermatozoides (Galarza et al., 2023). A pesar de ello, investigaciones en mamíferos silvestres, utilizando técnicas de congelación ultrarrápida han demostrado variabilidad en los resultados según la especie. Por ejemplo, se han obtenido resultados notables al emplear TCG + YH 20% y 100 mM de sacarosa en espermatozoides de gacela dama (*Nanger dama*), oso pardo (*Ursus arctos*), y jirafa (*Giraffa camelopardalis*). De igual manera para el gamo (*Dama dama*), el muflón (*Ovis aries musimon*), la gamuza (*Rupicapra rupicapra*), el sitatunga (*Tragelaphus speki*), y la

gacela dorcas (*Gazella dorcas*), en estas especies se obtuvieron resultados de aproximadamente el 40% en motilidad y viabilidad de espermatozoides de muestras epididimarias. Del mismo modo, las dimensiones morfométricas en estas especies silvestres tuvieron variación después de la congelación convencional y ultrarrápida (O'Brien et al., 2019).

En el caso de la congelación ultrarrápida fueron evidenciadas altas velocidades espermáticas de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, valores que se encuentran fuertemente correlacionados con la capacidad fecundante y en las técnicas de reproducción asistida; para que funcione la TRA los resultados o valores de motilidad espermática se deben encontrar dentro de las siguientes categorías: muy buena 80 a 100%, buena 60 a 79%, regular 40 a 59% y pobre < 40%; sus valores pueden variar según las condiciones de los medios utilizados y el método de criopreservación (Ferrian, 2011; Tapia & Tello, 2016). De esta manera, en el presente estudio no se afectaron los valores obtenidos en VCL, VSL y ALH durante y después del descongelamiento. Los resultados indican que entre los métodos de criopreservación la CU mejoró los parámetros cinéticos, progresividad e integridad de membranas. En contraposición con los resultados obtenidos mediante CC, los cuales fueron similares a investigaciones realizadas por Galarza et al., (2023), y Eder et al., (2013).

Es importante señalar, que no se han realizado estudios utilizando el método de congelación ultrarrápida en cobayos y existen pocas investigaciones utilizando la congelación convencional. Los resultados del presente estudio revelaron una mejoría en la criosupervivencia de espermatozoides de cobayos obtenidos de muestras epididimarias por flujo retrógrado, refrigeradas a 5°C durante 30 minutos y con la adición de 100 mM sacarosa y 1% BSA utilizando el protocolo de CU. Esta mejora está respaldada por la investigación realizada por Consuegra et al., (2019), quienes argumentaron que la adición de BSA al 1% lograba equilibrar la permeabilidad de la membrana plasmática y mitocondrial, proporcionando una crioprotección adicional contra el choque de frío y ayudando a la eliminación de ROS debido al estrés oxidativo. Según Martínez et al., (2022), esta estrategia contrarresta los efectos causados por la CU y conduce a mejores resultados. Cabe mencionar que es sustancial tomar en cuenta el tiempo de estabilización de la muestra en refrigeración para una adecuada protección de la membrana plasmática y acrosomal, así como la motilidad como lo menciona Colombo et al., (2022).

Con respecto al uso del diluyente y los agentes crioprotectores penetrantes y no penetrantes. La investigación realizada por Galarza et al., (2021), en espermatozoides epididimarios de perros,

en la que se empleó TCG-YH al 20 % y se adicionó 250 mM de sacarosa, demostró que el uso de la sacarosa afectó negativamente la motilidad posiblemente debido a cambios en la composición de los lípidos de la membrana que causó daño en la misma. Esto a su vez, condujo a una reacción acrosómica. No obstante, se obtuvo una mejor respuesta morfológica. Estos hallazgos sugieren que los resultados de la criopreservación de espermatozoides mediante CU dependen de la especie y del protocolo a utilizar, y, a su vez, de la concentración adecuada del agente crioprotector, como se demostró en las investigaciones realizadas por O'Brien et al., (2019). En contraste, un estudio realizado en gatos domésticos (*Felis catus*) por Colombo et al., (2022) utilizando dos sistemas de congelación ultrarrápida en pellets (Tris buffer, 20% de YH y 0,25 M de sacarosa) y pajuelas (1% BSA y 0,4 M de sacarosa) obtuvieron mejores resultados en muestras espermáticas utilizando la CU en pellets, ya que mantuvo mejor la integridad morfofuncional de los espermatozoides, su membrana y acrosoma intactos y además su capacidad fecundante. De manera similar a lo antes mencionado, la CU en la evaluación de integridad de membrana plasmática y ADN presentó mayores porcentajes de espermatozoides vivos, acrosoma intacto y cromatina intacta. En virtud de ello, se sugiere que la CU como protocolo de criopreservación idóneo para los espermatozoides de cobayo.

Como se presenta en este estudio la mayor significancia en la motilidad, integridad de membrana y el ADN se da en la CU, la cual mejoró la tasa de supervivencia de espermatozoides con una integridad plasmática y acrosomal en un 19,2% después del calentamiento en relación a un 8,2% en CC. Este método al tener agentes crioprotectores no penetrantes, como la sacarosa (100 mM), aumenta la viscosidad de los fluidos intra y extra celulares, evitando todo tipo de difusión molecular. Los ACNP en conjunto con el paso rápido sobre ciertos rangos de temperatura ($> 2000^{\circ}\text{C}/\text{min}$) forman cristales extracelulares, pero de menor tamaño en comparación con la CC causando menor daño en la membrana plasmática de los espermatozoides (Galarza et al., 2023). La sacarosa también ejerce una acción crioprotectora sobre las membranas, equilibrando las proteínas durante la deshidratación y rehidratación celular al realizar la criopreservación (Leslie et al., 1995). Estudios previos realizados por Shi et al., (2018) manifestaron que el uso de sacarosa al 10% (0.3 M), mejoraba los parámetros de motilidad e integridad de membrana después de la descongelación en espermatozoides de ratones, con una motilidad espermática del 21,0% y una integridad del ADN del 8,1%.

De ello resulta necesario admitir que la CU es un protocolo aplicable para mejorar los tiempos de congelación, por las inmersiones en nitrógeno líquido, sumado a esto, la CU tiene como ventajas

que, es un método sencillo, que implica el uso de volúmenes de muestra relativamente reducidos y no requiere de equipos costosos de criopreservación.

Conclusiones

Esta investigación concluye que la congelación ultrarrápida usando un diluyente a base de TCG y yema de huevo al 10% suplementado con 100 mM sacarosa y 1% BSA mejoró la motilidad, cinética, integridad de membranas y ADN de los espermatozoides de cobayo en comparación con la congelación convencional. A pesar que los resultados no fueron los esperados, constituye un hallazgo importante, que da una pauta de inicio o punto de partida para trabajar en mejorar este protocolo y sus medios de congelación.

Se debería probar la curva de congelación para identificar si causa un menor o mayor daño en la membrana de los espermatozoides y evaluar otros medios de congelación que podrían mejorar los parámetros cinéticos, morfológicos y causar menor daño en el ADN, y, por lo tanto, aumentar la capacidad fecundante de los espermatozoides de cobayo, lo que tendría aplicaciones en la reproducción asistida y en la conservación de esta especie.

Referencias

- Aboagla, E., & Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1160–1172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>
- Aguilar Rivera, N., Rodríguez, D. A., Castillo Morán, A., & Herrera Solano, A. (1). Sucroquímica, alternativa de diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar. *Multiciencias*, 12(1). <https://produccioncientificaluz.org/index.php/multiciencias/article/view/16880>
- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A., & Garde, J. 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)
- Aksoy, M., Akman, O., Lehimcioğlu, N. C., & Erdem, H. (2010). Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 120(1–4), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.014>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Armas R., S., Fernández A., V., Vásquez C., M., & Santiani A., A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquitectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22(3). <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i3.257>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>

Barahona Pauta, M. C., & Quishpe Erazo, O. M. (2012). *Introducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes*. Quito: UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/653>

Bóveda Gómez, P. (2021). *Congelación convencional y ultra-rápida de espermatozoides de rumiantes silvestres: influencia de la testosterona y la prolactina en la criorresistencia espermática*. Madrid: UAM. <http://hdl.handle.net/10486/699401>

Bóveda, P., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Esteso, M. C., López-Sebastián, A., Rizos, D., Bielli, A., Ungerfeld, R., & Santiago-Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLOS ONE*, 15(1), e0227946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>

Bordignon, V., & Smith, L. C. (1999). Ultraviolet-Irradiated Spermatozoa Activate Oocytes but Arrest Preimplantation Development After Fertilization and Nuclear Transplantation in Cattle1. *Biology of Reproduction*, 61(6), 1513–1520. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.6.1513>

Boyers, S. P., Davis, R. O., & Katz, D. F. (1989). [Automated semen analysis](#). *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*, 12(5), 165–200.

Cabrera V., P., & Pantoja A., C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2), 192-200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>

Cabeza, U., Ordóñez, C., Meza, A., & Cucho, H. (2020). Morphological and morphometric characterization of the guinea pig sperm (*Cavia porcellus*). *SPERMOVA*, 10(2), 94–101. <https://doi.org/10.18548/aspe/0008.14>

Cabodevila, J. & Teruel, M. (2001). Criopreservación de embriones bovinos. Biotecnología de la reproducción (G. A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina, Capítulo X, pp. 49-174.

Calderón Guamán, D., & Pintado Sangurima, S. (2023). *Efecto de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de cobayo sobre las características espermáticas post-descongelación*. Universidad de Cuenca.

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/42961>

Canorio, N., Paredes, F., & Valdivia, M. (2015). Agentes Crioprotectores Alternativos para el Congelamiento Lento de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (Vicugna pacos). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 434.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>

Carlotto, G. (2009). *Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/749>

Castro Acevedo, E. (2021). Criopreservación del espermatozo del abulón azul *Halotis fulgens*: Efecto de los crioprotectores y la tasa de enfriamiento en la viabilidad espermática. Ciencias. CICESE, Baja California. 65 pp.

<http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3636>

Caycedo, A. J. (2000). Experiencias investigativas en la producción de cuyes: contribución al desarrollo técnico de la explotación. *Pasto-Colombia Univ. De Nariño*, 262

Chango Mise, M. (2014). *Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (Cavia Porcellus) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi*. Latacunga: UTC.

<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2863>

Chauca, L. (1997). *Produccion de cuyes (Cavia Porcellus)*. FAO.

<https://www.fao.org/3/v6200t/v6200T05.htm>

Colombo, M., Morselli, M. G., Zahmel, J., & Luvoni, G. C. (2022). Ultra-Rapid Freezing Preserves Morphofunctional Integrity and Fertilizing Ability of Epididymal Cat Spermatozoa. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.866953>

- Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, 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>
- Cucho, H., Gallegos, M., Ccoiso, R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C., & Valverde, A. (2021). Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (*Lama glama*) usando el sistema ISAS® CASA-Morph. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(1), e19506. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i1.19506>
- Durrant Barbara S. (1990). Semen Collection, Evaluation, and Cryopreservation in Exotic Animal Species: Maximizing Reproductive Potential, Institute for Laboratory Animal Research: *ILAR Journal*, Volume 32, Issue 1, 1990, Pages 2–10, <https://doi.org/10.1093/ilar.32.1.2>
- Eder, S., Müller, K., Jewgenow, K., Hribal, R., & Schumann, K. (2013). Cryopreservation of guinea pig spermatozoa – Challenges and first success. *Reproductive Biology*, 13, 24. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.01.014>
- Esteso, M. C., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., Lopez-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2018). Effect of two cooling protocols on the post-thaw characteristics of Iberian ibex sperms. *Cryobiology*, 80, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.003>
- Farah, O. I., Cuiling, L., Jiaojiao, W., & Huiping, Z. (2013). Use of fluorescent dyes for readily recognizing sperm damage. *Journal of Reproduction & Infertility*, 14(3), 120–125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24163795/>
- Fawcett, D. W., & Hollenberg, R. D. (1963). Changes in the acrosome of guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Zeitschrift For Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 60(2), 276–292. <https://doi.org/10.1007/BF00350481>
- Fernandez, A., Gonzalvo, M. del carmen, Clavero, A., Assin, R., & Zamora, S. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 17–25.

<https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatologica-para-bancos-de-semen/>

Ferrian, S. (2011). Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post- descongelación. Valencia: *Universidad Politécnica de Valencia*.
<http://hdl.handle.net/10251/12203>

Florman, H. M., & Storey, B. T. (1982). Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Developmental Biology*, 91(1), 121–130. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90015-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90015-X)

Fraser, L. R. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction*, 13(suppl 1), 9–19. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.9

FREUND, M. (1969). Interrelationships among the characteristics of guinea-pig semen collected by electro-ejaculation. *Reproduction*, 19(3), 393-403. Retrieved Jul 9, 2024, from <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0190393>

Galarza Lucero, D. A. (2020). Optimización de la criopreservación (refrigeración y congelación) de espermatozoides de morueco para su aplicación en inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) transcervical (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
<https://hdl.handle.net/20.500.14352/11133>

Galarza, D., Duma, M., X. Samaniego, J., Soria, M., & Méndez, S. (2023). *Cryopreservation of Domestic and Wild Animal Spermatozoa: Update of Knowledge*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.111918>

Galarza, D. A., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Taboada, J., Sánchez-Calabuig, M. J., 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>

- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. Institute for Laboratory Animal Research: *ILAR Journal*, 41(4), 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol*. *Human Reproduction*, 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- García-Herreros, M., Aparicio, I. M., Barón, F. J., García-Marín, L. J., & Gil, M. C. (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29(5), 553–563. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2006.00696.X>
- García, R. (2000). *Efecto de los Inhibidores de H⁺ ATPasas durante la Maduración, Capacitación y Reacción Acrosomal del Espermatozoide de Conejo* (pp. 24–25). Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/1922>
- Garde, J. J., Soler, A. J., Cassinello, J., Crespo, C., Malo, A. F., Espeso, G., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2003). Sperm Cryopreservation in Three Species of Endangered Gazelles (Gazella cuvieri, G. dama mhorr, and G. dorcas neglecta). *Biology of Reproduction*, 69(2), 602–611. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012914>
- Giraldo, G., & Jairo, J. (2011). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/9115>
- González-Figueroa, H., & Molfino González, H. M. (2017). Biotecnología reproductiva. *Biotempo*, 5, 5–11. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.886>
- Gonzalez, H., & Conejo, D. (2009). Bases celulares y moleculares de la capacitación espermática. In *Scientia*.

Gonzalez, R. (2004). *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino*. <https://doi.org/10.11606/T.10.2004.tde-19102004-101719>

GRAVANCE, C. G., VISHWANATH, R., PITT, C., GARNER, D. L., & CASEY, P. J. (1998). Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. *Journal of Andrology*, 19(6), 704–709. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02079.x>

Hafez, E. S. E. (2002). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. In B. Habez (Ed.), *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7th ed.).

Hancock J.L. & Hovell G.J.R. (1959). The collection of boar semen. *The Veterinary Record*. 71: 664-665. *Referencias - Publicación de investigaciones científicas*. (n.d.). Universidad de Edimburgo. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19602201228>

Hernández, J., Moreno, L., Navarro, M., Ambriz, D., & Rodríguez, J. (2018). *Ventajas de la vitrificación con relación a la congelación en eyaculados de ovino*. *Revista de Salud Animal*, 40 (1), 00. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000100001

Hernández, P. J. E., Fernández, R. F., Rodríguez, S. J. L., Negrete, R. M., Soto, M. Y. G., & García, R. A. D. (2012). Efecto de la criopreservación de semen de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) sobre su viabilidad y estado acrosomal. *Revista de Salud Animal*, 34(3), 188–191. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X20120003000009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Guevara Lozano, P. & Herrán Barrero, G. (2021). Criopreservación de gametos y embriones en animales domésticos. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ibagué. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12494/33618>

High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security. (2016). *Sustainable agricultural development for food security and nutrition: what*

roles for livestock?. Nathanaël Pingault.
https://www.louiseofresco.com/pdf/UK_Publications/2016_HLPE-Report-10_EN.pdf

Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2014). Summary for Policymakers. In *Climate Change 2013 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1–30). introduction, Cambridge: Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., & Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191–200.
[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)

Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., Sanchez, R., Risopatron, J., Damjanoski, I., & Isachenko, E. (2012). Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa Without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *Journal of Andrology*, 33(3), 462–468. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013789>.

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M. G. M., Håård, M. C., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52(4), 641–658. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00159-4)

Johnson, J. E., Boone, W. R., & Blackhurst, D. W. (1996). Manual versus computer-automated semen analyses. Part III. Comparison of old versus new design MicroCell Chambers*. *Fertility and Sterility*, 65(2), 446–447. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58115-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58115-1)

- Kumar, D. S., Nakamura, K., Nishiyama, S., Ishii, S., Noguchi, H., Kashiwagi, K., & Yoshida, Y. (2003). Optical and electrical characterization of plasma polymerized pyrrole films. *Journal of Applied Physics*, 93(5), 2705–2711. <https://doi.org/10.1063/1.1542692>
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3592–3597. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3592-3597.1995>
- Lucio, Rosa Angélica, Tlachi, José Luis, López, Aurora Adriana, Zempoalteca, René, & Velázquez-Moctezuma, Javier. (2009). Análisis de los parámetros del eyaculado en la rata Wistar de laboratorio: descripción de la técnica. *Veterinaria México*, 40(4), 405-415. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922009000400007&lng=es&tlng=es.
- Machuca León, W. (2021). Efecto de Tris Ácido Cítrico Glucosa Yema de Huevo 20 en espermatozoides de cobayo *Cavia porcellus* pre y post crio preservación. Universidad Técnica Particular de Loja. <https://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/29054>
- Martínez-Duran, J., Duverger-Tellez, O., Díaz-Martínez, N., Interian-Alvarez, L., Denis-García, R., & Palacios-Espinosa, A. (2022). Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino. *Revista MVZ Córdoba*, 27(s), e2632. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2632>
- Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D. C., & Dode, M. N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.018>
- Maynard, L. L. (2012). *Nutrición Animal*. Mcgraw Hill, Ed.; 4th ed.

- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125–C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mesa, A. M., & Henao R, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2908–2915. <https://doi.org/10.21897/rmvz.260>
- Meyers, S.A. (2012). Cryostorage and Oxidative Stress in Mammalian Spermatozoa. In: Agarwal, A., Aitken, R., Alvarez, J. (eds) *Studies on Men's Health and Fertility. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-776-7_3
- Meyers, S. A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.026>
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., & Graham, J. (2010). Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(s2), 57–66. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x>
- Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., & Graham, J. K. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215–218. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2006.03.003>
- O'Brien, E., Esteso, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., & 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>
- Ojeda, R. A., Chillo, V., & Díaz Isenrath, G. B. (2000). *Libro rojo de mamíferos amenazados de la Argentina* (pp. 33-115). Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos.

- Ortiz, N. (1999). Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem. *Estudio de Las Características Espermáticas y de La Criopreservación En Espermatozoides Epididimarios de Ciervo Ibérico Obtenidos Postmortem*.
<https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/5d399a5a2999520684465f79>
- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., & Shimada, M. (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71, 491-498.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.014>
- Palma, G. A. (2008). Biotecnología de la reproducción: Ciencia, tecnología y sociedad.
<http://hdl.handle.net/11336/198981>
- Palomeque Almeida, M. (2021). Inseminación artificial en cobayas (*Cavia porcellus*) de tercer y cuarto parto aprovechando el celo postparto con semen fresco post-mortem. Centro Experimental Uyumbicho. Quito: UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24615>
- Páez, E. (2012). *MODULO REPRODUCCION ANIMAL AVANZADA*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Tunja. CEAD.<https://studylib.es/doc/6638731/modulo-reproduccion-animal-avanzada-edwin>
- Pardo Jara, A. (2021). *Oxidación electroquímica del glicerol en medio alcalino sobre nanomateriales de Pt-Rh*. Alicante: RUA.<http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/116600>
- Pérez, M. G., Zevallos, J., & Pérez, U. H. (2014). RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACAS DEL CONDUCTO DEFERENTE DURANTE LA EPOCA REPRODUCTIVA. *SPERMOVA.*, 4(2): 139-144.
http://spermova.pe/site2/index.php?option=com_content&view=article&id=14:revista-spermova-nro-4-vol-2-2014&catid=9&Itemid=101

- Pineda, S., & Pinilla, S. (2007). *Comparación de dos diluyentes Lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo en la preservación de semen equino.* https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/315
- Plemel, J. R., Caprariello, A. V., Keough, M. B., Henry, T. J., Tsutsui, S., Chu, T. H., Schenk, G. J., Klaver, R., Yong, V. W., & Stys, P. K. (2017). Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *The Journal of cell biology*, 216(4), 1163–1181. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602028>
- Ponglowhapan, S., & Chatdarong, K. (2008). Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*, 69(6), 666–672. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.11.005>
- Pradlee, J., Estes, M. C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J. A., Urrutia, B., & Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.036>
- Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Quispe, W. (2018). *Características Espermáticas Y Calidad Del Semen De Dos Razas De Cuyes (Cavia Porcellus), En El Valle De Cajamarca.* Cajamarca. Universidad de Cajamarca. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/2132>
- Rahimizadeh, P., Rezaei Topraggaleh, T., Bucak, M. N., Ziarati, N., Hasirbaf, A., Taher-Mofrad, S. M. J., Maroufizadeh, S., & Shahverdi, A. (2021). Effect of Bovine Serum Albumin Supplementation in Tris-Soybean Lecithin-Based Extender on Quality of Chilled Ram Epididymal Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 19(1), 33–40. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0041>

- Rayan, M., Anwer, A., El-Badry, D., & Zain, A. E.-D. (2023). The Effects of Bovine Serum Albumin (BSA) Supplementation on Post-thaw Quality of Cryopreserved Bull Semen., 3(3), 43–54. <https://doi.org/10.21608/sjyr.2023.302847>
- Restrepo Betancur, G., Vásquez Araque, N., & Garcia, E. A. (2010). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *CES Medicina Veterinaria Y Zootecnia*, 119–129. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/1038>
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rodríguez, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* (Primera edicion). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA. <https://cerlalc.org/rilvi/recoleccion-y-manipulacion-seminal-in-vitro-11788/>
- Roustan, A., & Maillot, D. (1991). *Efecto de la inyección de GnRH (Receptal) sobre la fertilidad y la productividad numérica de conejas sometidas a cubrición natural*. 89–93. <https://ddd.uab.cat/record/73916>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Scott, J. v., & Dziuk, P. J. (1959). Evaluation of the electroejaculation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *The Anatomical Record*, 133(4), 655–664. <https://doi.org/10.1002/ar.1091330406>
- Shi, X., Hu, H., Ji, G., Zhang, J., Liu, R., Zhang, H., & Li, M. (2018). Protective Effect of Sucrose and Antioxidants on Cryopreservation of Sperm Motility and DNA Integrity in C57BL/6 Mice. *Biopreservation and Biobanking*, 16(6), 444–450. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0037>

- Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43(4), 233–241. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01054.x>
- Moreno, J., Astorga, R. J., Luque, I., Coloma, M. A., Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Gómez-Guillamon, F., Salas-Vega, R., & López-Sebastián, A. (2009). Influence of recovery method and microbial contamination on the response to freezing–thawing in ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 59(3), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.09.012>
- Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., & Ulutaş, P. A. (2009). Influence of Various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bull Semen. *Acta Veterinaria Brno*, 78(3), 463–469. <https://doi.org/10.2754/AVB200978030463>
- Solís, R., & Chávez, P. (2015). *Evaluación de producción In vitro de embriones en cuyes (Cavia porcellus)* (p. 87). LATACUNGA / UTC. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2895>
- Stornelli, M. C., & Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. In *SEDICI* (Vol. 25, Issue 2, pp. 20–35). Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11180>
- Swain, J. E., & Smith, G. D. (2010). Cryoprotectants. *Fertility Cryopreservation*, 24–38. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511730207.005>
- Tapia Pesántez, D. A., & Tello Larriva, D. J. (2016). *Evaluación cuali-cuantitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo de cuyes (Cavia porcellus) criollos y mejorados en dos edades reproductivas* (Bachelor's thesis). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/25404>

- Valverde Abarca, A., & Madrigal Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Vásquez E., M., Cueva M., S., Cordero R., A., Gonzales C., M. L., & Huanca L., W. (2011). Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia in vivo e in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22(3), 190-198. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i3.256>
- Vermes, I., & Haanen, C. (1994). Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Advances in clinical chemistry*, 31, 177–246. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(08\)60336-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(08)60336-4)
- Varner, D. D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70(3), 448–462. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.023>
- Von Bilderling, Catalina. (2013). Detección, localización y análisis de eventos singulares de reconocimiento molecular mediante microscopías avanzadas. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.) 59–78. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5343_VonBilderling
- Wagner, J., & Manning, P. (1976). The biology of the guinea pig. In *American College of Laboratory Animal Medicine* (pp. 35–50). Academic Press.
- White, I. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 639. <https://doi.org/10.1071/RD9930639>
- Woelders, H., & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 49(3), 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.09.001>

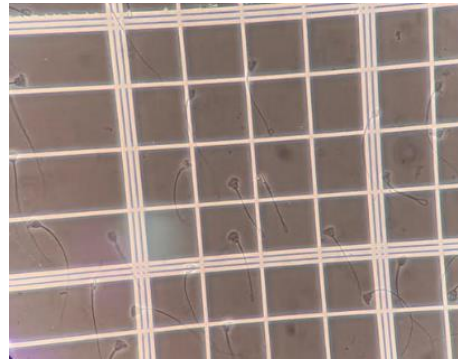
Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*, 156, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.002>

Anexos

Anexo A. Recuperación de espermatozoides epididimarios.



Anexo C. Evaluación de la concentración de las muestras espermáticas.



Anexo B. Muestras atemperándose en el baño maría (37°).



Anexo D. Análisis de Muestras espermáticas en el sistema CASA.



Anexo E. Pajuelas expuestas a los vapores de nitrógeno líquido



Anexo G. Preparación del dispositivo de calentamiento (STC-3008).



Anexo F. Gotas de muestra pura directo sobre nitrógeno líquido.



Anexo H. Calentamiento de Pellets en el dispositivo (STC-3008).



Anexo I. Obtención de las muestras calentadas.



Anexo K. Evaluación de membranas acrosomal y plasmática por medio de fluorescencia.



Anexo J. Evaluación de las muestras descongeladas y calentadas.



Anexo L. Aplicación del SpermBlue a la muestra pura



Anexo M. Placa antes de ser homogenizada para evaluar la morfología de los espermatozoides.



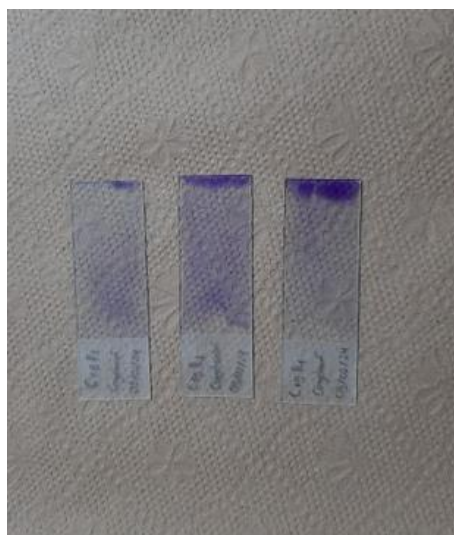
Anexo N. Homogenizar el SpermBlue + muestra pura



Anexo O. Frotis para el análisis morfológico de los espermatozoides



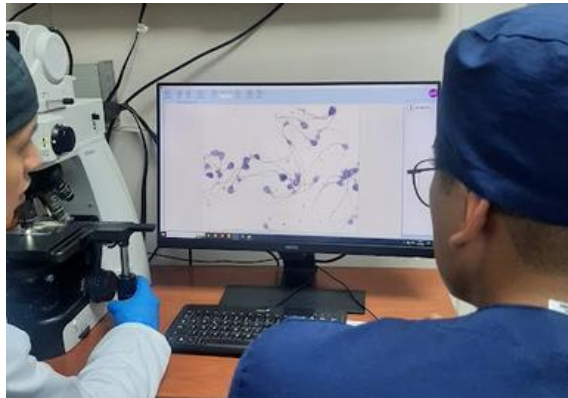
Anexo P. Placa con tinción de SpermBlue



Anexo Q. Fijación de las placas con resina + cubreobjetos largos.



Anexo R. Análisis de la morfometría de los espermatozoides del cobayo.



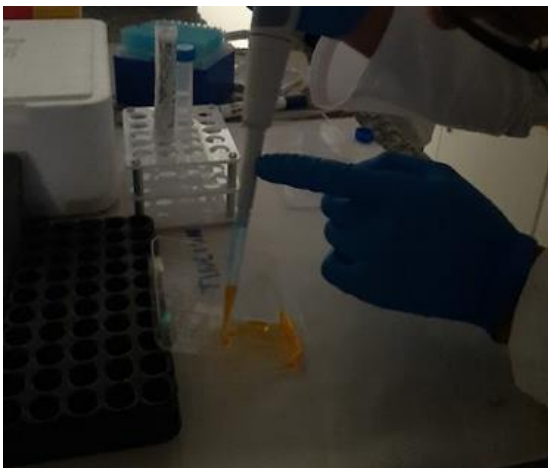
Anexo S. Placas fijadas con la solución fijadora (Solución de carnoy + ácido acético).



Anexo T. Placas sumergidas en solución tampón.



Anexo U. Teñido de las placas con fluorocromo naranja de acridina



Anexo V. Secado al aire para la evaluación de la integridad de ADN.



Anexo W. Llevados a la incubadora para la evaluación de la integridad de ADN.



Anexo X. Lavado con agua destilada.



Anexo Y. Evaluación de la integridad de ADN.

