

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

TEMA:

**EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE
SEMEN EQUINO.**

ASESOR:

PROF. ALEX SOLÍS DVScPhD

ESTUDIANTE:

FELIX ALBERTO CONTRERAS

4-797-2020

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

**EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN
EQUINO**

**TRABAJO DE TESIS SOMETIDO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS**

**PERMISO DE PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DEBE SER
OBTENIDA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO:

Prof. Dr. Alex Solís Corrales DVScPhD _____
DIRECTOR

Prof. Dr. Reinaldo de Armas. PhD _____
COMITÉ

Prof. Neftalí Aparicio Ruíz. MSc. _____
COMITÉ

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

2022

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VII
DEDICATORIA.....	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Anatomía del sistema reproductor del macho equino	3
2.1.0 Órganos reproductivos externos	3
2.2 Órganos reproductivos internos	5
2.3 Anatomía y fisiología del espermatozoide equino:	7
2.4 La espermatogénesis	9
2.5 Capacitación espermática	9
2.6 La reacción acrosómica	10
2.8 Estrés osmótico.....	11
2.9 Estrés térmico	11
2.10 Estrés oxidativo	12
2.11 Apoptosis	12
2.12 Procedimientos para la criopreservación de semen equino	13
2.12.0 Colecta de semen	13
2.13 Evaluación seminal	14
a). Evaluación del color y aspecto del eyaculado.....	15
b). Evaluación de volumen espermático.....	16
c). Evaluación de la concentración espermática	16
d). Evaluación de la motilidad espermática	17
e). Evaluación de la morfología espermática	20
2.14 Dilución de semen.....	22
2.16 Centrifugación seminal.....	23
2.17 Centrifugación coloidal	25
2.18 Congelación de semen.....	27
2.19 Diluyentes utilizados en la criopreservación de semen equino	28
2.20 Descongelación de semen	30
III. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos específicos	31
IV HIPÓTESIS.....	31
V MARCO METODOLÓGICO	32
5.1 Lugar de estudio	32
5.2 Animales experimentales	32
5.3 Colecta del semen.....	33
5.4 Análisis de semen crudo	33
5.5 Dilución del semen	34
5.6 Centrifugación de semen	34

5.7 Envasado del semen.....	34
5.8 Análisis de semen centrifugado	34
5.9 Enfriamiento y congelación de semen.....	35
5.10 Descongelación de semen	35
5.11 Análisis estadístico.....	35
5.12 Modelo matemático	36
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1 Resultados y discusión de la motilidad progresiva (MP)	37
6.2 Resultados y discusión del vigor espermático.....	42
6.3 Resultados y discusión de sobrevivencia espermática	45
VII CONCLUSIONES	48
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Animales experimentales.	33
Figura 2: Porcentaje de motilidad progresiva (media) por tratamientos.	38
Figura 3: Vigor espermático promedio obtenido en cada tratamiento.	43
Figura 4: Porcentaje promedio de sobrevivencia espermática en cada tratamiento.	46

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Arreglo factorial 2x2.....	36
Tabla 2: Parámetros seminales de semen fresco previos al proceso de criopreservación.....	37
Tabla 3: Valores promedio de motilidad progresiva obtenida en cada tratamiento. ..	38
Tabla 4: Valores promedio del vigor espermático de los espermatozoides obtenidos en cada tratamiento.....	43
Tabla 5: Tasa de sobrevivencia promedio en los tratamientos evaluados.	45

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida, salud y fortaleza para realizar este proyecto con éxito.

A mi madre por el apoyo incondicional para realizar todos los proyectos que tengo en la vida.

A el hermano que me regaló la vida, Carlos Fuentes por el apoyo a lo largo de esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Alex Solís Corrales por el apoyo y la orientación para realizar este proyecto.

A todos los propietarios de caballos que me han permitido utilizar sus animales para realizar este trabajo: Joel Ríos, Ángel Jované, Ing. José Aníbal Lorenzo, entre otros.

A mis amigos de la Universidad: Carolina Ibarra, Gerson Olivares, Algis Sánchez, Franklin Montezuma, Ansella Patiño y Luis González.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi corazón a mi ángel que se fue al cielo “Abuela Martina Guerra” gracias por los momentos que estuviste a mi lado apoyándome siempre.

Dedico esta tesis a mi madre María Contreras, la reina de mi vida, tus oraciones y bendiciones me protegen y me llevan por buenos caminos. No hay palabras para describir lo orgulloso y agradecido que estoy con mi Padre celestial por tenerte a mi lado.

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar dos protocolos de criopreservación de semen equino. Se utilizaron 2 sementales de la raza Cuarto de Milla, en edades entre 8 a 10 años. La condición corporal de estos sementales era aproximadamente entre 6 y 7 (en escala de 1-9). Se criopreservaron 3 eyaculados por cada semental, de manera que cada eyaculado fue criopreservado empleando dos métodos de centrifugación, 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos. Posteriormente se analizaron los parámetros de motilidad progresiva, vigor espermático y sobrevivencia espermática en el semen poscentrifugación y posdescongelación. Los datos fueron ordenados en un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 2 por 2 con cuatro tratamientos. T1: Semen centrifugado a 600 g por 11 minutos y evaluado poscentrifugación, T2: Semen centrifugado a 750 g por 8 minutos y evaluado poscentrifugación, T3: semen centrifugado a 600 g por 11 minutos y evaluado posdescongelación, T4: semen centrifugado a 750 g por 8 minutos y evaluado posdescongelación. Para la evaluación estadística se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) y las medias entre los tratamientos se compararon por la prueba de Tukey. Todos los datos fueron analizados utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión: 28.0.0.0 (190). El ANOVA reveló diferencias significativas ($P < 0.01$) para la sobrevivencia espermática con medias de 56.67 ± 8.16 y 46.67 ± 8.16 por ciento, para el protocolo 750 g por 8 minutos y 600 g por 11 minutos, respectivamente en el semen posdescongelación. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), para los parámetros motilidad progresiva (T1: 66.64 ± 8.16 , T2: 64.17 ± 7.36 , T3: 70.83 ± 10.21 y T4: 71.67 ± 10.80) y vigor espermático (T1: 3.42 ± 0.2 , T2: 3.5 ± 0.0 , T3: 2.83 ± 0.4 y T4: 2.83 ± 0.4), en el semen poscentrifugación y posdescongelación. Se concluye que el semen centrifugado a una fuerza de 750 g por 8 minutos, posee una mayor sobrevivencia espermática posdescongelación, aunque no demuestra superioridad en términos de motilidad progresiva y vigor espermático sobre el semen centrifugado a una fuerza de 600 g por 11 minutos.

Palabras clave: Espermatozoides, caballo, congelación, descongelación, criopreservación, centrifugación.

EVALUATION OF TWO EQUINE SEMEN CRYOPRESERVATION PROTOCOLS

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate two equine semen cryopreservation protocols. Two Quarter Horse stallions, aged 8 to 10 years, were used. The body condition of these stallions was approximately between 6 and 7 (on a scale of 1-9). Three ejaculates were cryopreserved for each stallion, so that each ejaculate was cryopreserved using two centrifugation methods, 600 g for 11 minutes and 750 g for 8 minutes. Subsequently, the parameters of progressive motility, sperm vigor and sperm survival were analyzed in the semen after centrifugation and after thawing. The data were arranged in a completely randomized block design with 2 for 2 factorial arrangement with four treatments. T1: Semen centrifuged at 600 g for 11 minutes and evaluated postcentrifugation, T2: Semen centrifuged at 750 g for 8 minutes and evaluated postcentrifugation, T3: Semen centrifuged at 600 g for 11 minutes and evaluated post-thawing, T4: Semen centrifuged at 750 g for 8 minutes and evaluated post-thawing. For statistical evaluation, generalized linear models (GLM) were fitted and means between treatments were compared by Tukey's test. All data were analyzed using IBM SPSS Statistics version: 28.0.0.0 (190). ANOVA revealed significant differences ($P < 0.01$) for sperm survival with means of 56.67 ± 8.16 and 46.67 ± 8.16 percent, for the 750 g for 8 minutes and 600 g for 11 minutes protocol, respectively in post-thawed semen. No significant differences ($P > 0.05$) were found, for the parameters progressive motility (T1: 66.64 ± 8.16 , T2: 64.17 ± 7.36 , T3: 70.83 ± 10.21 and T4: 71.67 ± 10.80) and sperm vigor (T1: 3.42 ± 0.2 , T2: 3.5 ± 0.0 , T3: 2.83 ± 0.4 and T4: 2.83 ± 0.4), in post-centrifugation and post-thawing semen. It is concluded that semen centrifuged at a force of 750 g for 8 minutes, had a higher post-thaw sperm survival, although it does not superiority in terms of progressive motility and sperm vigor over semen centrifuged at a force of 600 g for 11 minutes.

Key words: Spermatozoa, horse, freezing, thawing, cryopreservation, centrifugation

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen consiste en el almacenamiento de espermatozoides a bajas temperaturas de (-196 °C) en Nitrógeno líquido. Si los espermatozoides soportan los procesos de congelación y descongelación, su integridad puede mantenerse indefinidamente en nitrógeno líquido (Brinsko y Varner, 1992; Brinsko, 2011).

La congelación de semen es una de las biotecnologías más antiguas relacionadas a la reproducción que han contribuido para la difusión de material genético de animales de interés zootécnico (Ferreira, 2008). Además, el uso de semen congelado minimiza la propagación de enfermedades, elimina barreras geográficas y preserva el material genético de un animal por tiempo ilimitado (Alvarenga *et al.*, 2016).

El progreso del proceso de congelación de semen equino está asociado al uso de nuevos crioprotectores que no sean glicerol, nuevos diluyentes comercialmente disponibles y las técnicas de separación de esperma. Permitiendo así el aumento en las tasas de fertilidad y la congelación de aquellos equinos considerados como pobres congeladores (Alvarenga *et al.*, 2016).

La eliminación del exceso de plasma seminal es un procedimiento indispensable para concentrar el esperma, antes de congelar el semen, aunque se puede añadir menos del 5% de plasma seminal manteniendo la calidad del semen descongelado (Alvarenga, 2012).

La centrifugación de semen es la técnica más utilizada para concentrar esperma de sementales equinos, sin embargo, este procedimiento puede afectar negativamente la motilidad, integridad y la tasa de recuperación de los espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 2012, 2016). Especialmente cuando el esperma se compacta firmemente en el fondo de los tubos después de una centrifugación vigorosa (Loomis, 2006).

Las altas fuerzas centrifugas causan una fuerte adhesión del granulo de esperma, lo cual es perjudicial para los espermatozoides, mientras que las fuerzas bajas promueven baja tasa de recuperación de espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 2016). Incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación logran alterar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos (Restrepo *et al.*, 2016).

El semen de sementales equinos, generalmente se centrifuga durante 10 a 15 minutos entre 400g y 600g, recuperando aproximadamente el 75% del esperma (Loomis, 2006). No obstante, la mejor fuerza y tiempo para una buena tasa de recuperación de esperma es de 600 g durante 10 minutos (Alvarenga *et al.*, 2016 y Dell' aqua *et al.*, 2001).

La centrifugación coloidal (CC) es un método que utiliza altas fuerzas de centrifugación, empleando un líquido amortiguador colocado en la parte inferior del tubo que contiene el semen en la centrifuga (Alvarenga *et al.*, 2016). Con el objetivo de maximizar la recuperación de esperma y evitar la compactación de los espermatozoides, minimizando el daño a los espermatozoides causados por la

centrifugación (Alvarenga, 2012). Logrando así, una mejor criosupervivencia y una supervivencia más larga después de la descongelación, beneficiando al semen de equinos de elite y con poca fertilidad (Morrell, 2017).

La técnica de centrifugación seminal implica el proceso de retirar el líquido amortiguador sin aspirar los espermatozoides, para evitar posibles efectos nocivos de la solución, además implica el uso de otros materiales que limitan el uso de esta técnica en la práctica (Hoogewijs, 2010). Sin embargo, Morrell y Rodríguez (2016), indican que esta técnica es rápida y sencilla de realizar siempre y cuando se cuente con una centrifuga basculante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía del sistema reproductor del macho equino

2.1.0 Órganos reproductivos externos

El escroto es un saco ligeramente pendular ubicado en la región inguinal que contiene los testículos, protege y regula la temperatura de los testículos manteniéndola a 33 ° C (Baky *et al.*, 2020). La piel del escroto debe ser delgada y flexible, los testículos del semental normalmente están posicionados horizontalmente dentro del escroto con la cola del epidídimo orientado caudalmente y el cordón espermático de manera craneal dorsal (Ball, 2008 y McCue, 2014).

Los Testículos son los órganos principales de la reproducción, su tamaño es de 7 a 11 cm de largo por 6 cm a 5 cm de ancho. Los testículos son responsables de la

producción de espermatozoides (mediante la espermatogénesis) y la hormona sexual masculina, testosterona, que promueve el desarrollo de glándulas sexuales accesorias que conducen a la aparición de caracteres y comportamientos sexuales secundarios de los machos, como la actividad de apareamiento y también induce el crecimiento corporal (Amann, 1981 y Baky *et al.*, 2020).

Los testículos deben ser aproximadamente simétricos en tamaño y consistencia (consistencia normal se aproxima la de la porción carnosa de tu mano en el base del pulgar con el pulgar extendido), además ambos testículos deben poder moverse libremente dentro del escroto (Ball, 2008 y McCue, 2014).

El epidídimo del semental es un conducto tubular único, con más de 70 metros de longitud muy contorneado que se encuentra junto a los testículos, consta de cabeza, cuerpo y cola. El epidídimo actúa como área de almacenamiento y lugar de maduración final de los espermatozoides antes de la eyaculación. (Little y Holyoakn, 1992; Baky *et al.*, 2020).

El pene del semental equino es de tipo musculo-cavernoso y se compone de tres partes: la raíz, el cuerpo y el glande. La raíz del pene se compone de dos pilares y el bulbo eréctil del pene, los dos pilares se derivan de la superficie ventral del arco isquiático y se unen de 10 a 15 cm distalmente para formar el cuerpo cavernoso del pene. El bulbo del pene comienza en la línea media, caudal a las glándulas bulbouretrales y se continúa directamente con la capa eréctil de la uretra pélvica ventralmente al arco isquiático. El bulbo del pene es el comienzo agrandado del cuerpo

esponjoso del pene, que rodea la uretra del pene después de conectar el estrato cavernoso. El glande del pene es el extremo libre más grande del pene (Little y Holyoakn, 1992; Baky *et al.*, 2020).

El prepucio es una funda para proteger el pene no erecto y consta de un pliegue prepucial interno y externo, el pliegue externo forma el orificio prepucial y el pliegue interno forma el anillo prepucial, el pliegue prepucial extra sirve como reserva de piel para el pene alargado durante una erección. El prepucio y el escroto están predispuestos al edema porque su ubicación dependiente y la falta de la musculatura circundante no promueven un drenaje linfático eficiente (Little y Holyoakn, 1992; Baky *et al.*, 2020).

2.2 Órganos reproductivos internos

Las glándulas sexuales accesorias del semental son las glándulas vesiculares (vesículas seminales), las ampollas de los conductos deferentes, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Las secreciones de las glándulas sexuales accesorias forman aproximadamente el 95% de la capacidad de eyaculación y se denominan comúnmente como plasma seminal (Little y Holyoakn, 1992; Baky *et al.*, 2020).

Las ampollas son las porciones distales engrosadas de los conductos deferentes. En el caballo maduro, miden entre 15 a 20 mm de diámetro y entre 20 a 25 cm de longitud. Las ampollas se colocan sobre el cuello de la vejiga y pasan por debajo del istmo de la próstata, donde se estrechan abruptamente para formar conductos excretores, cada conducto excretor ampular es paralelo al conducto excretor de la glándula vesicular

ipsilateral hasta su extremo (Baky *et al.*, 2020). Un verdadero conducto eyaculatorio para secreciones de las glándulas ampulares y vesiculares combinadas no existe en el macho equino (Little y Holyoakn, 1992).

Las glándulas vesiculares son bolsas piriformes de paredes delgadas responsables de la fracción de gel del eyaculado del semental. Cada una consta de cuello, cuerpo y fondo. El fondo y el cuerpo de las glándulas vesiculares se encuentran laterales a las ampollas y pueden distenderse considerablemente, los cuellos de cada glándula vesicular se colocan caudalmente y pasan por debajo del istmo prostático, en paralelo al conducto excretor de la ampolla ipsilateral. Las glándulas vesiculares se abren hacia la uretra pélvica a través de las aberturas eyaculatorias del colículo seminal (Baky *et al.*, 2020).

La glándula prostática compuesta por dos lóbulos piramidales unidos por un istmo transversal delgado, en el semental adulto, cada lóbulo mide entre 4 y 6 cm de ancho y entre 2 y 4 cm de grosor (Baky *et al.*, 2020). La próstata se encuentra en el extremo craneal del músculo uretral y tiene un carácter esponjoso y nodular, de cada lóbulo emergen varios conductillos excretores, que pasan juntos como haces dorsolaterales a los conductos ipsilaterales de las ampollas y glándulas vesiculares. Estos conductillos excretores se abren por separado en los lados laterales del colículo seminal (Little y Holyoakn, 1992).

Las glándulas bulbouretrales emparejadas están situadas dorso-lateralmente a la uretra pélvica en el arco isquiático, las glándulas son ovoides y miden entre 3 y 4 cm de largo y entre 2 y 3 cm. amplio. Están rodeados por el delgado músculo

bulboglandularis y producen el líquido preeyaculatorio común; sin embargo, pueden producir y aportar líquido durante todas las etapas de la eyaculación. (Little y Holyoakn, 1992; Baky *et al.*, 2020).

2.3 Anatomía y fisiología del espermatozoide equino:

El espermatozoide de los mamíferos consta de 5 regiones; cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Desde el punto de vista funcional, es un transportador de la información genética (Ortega-Ferrusola, 2011). El espermatozoide está revestido por la membrana plasmática, compuesta por diferentes tipos de proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucolípidos y carbohidratos. También posee enzimas en el acrosoma, que actúan como la barrera principal entre el espermatozoide y el ambiente externo, debido a su característica de permeabilidad selectiva (Clavijo, 2014).

La membrana plasmática del espermatozoide equino contiene menor porcentaje de colesterol que la del toro o la del cerdo. Esto confiere menor tolerancia a los descensos de temperatura (Ortega-Ferrusola, 2011). La membrana plasmática consta de proteínas integradas entre los lípidos, las cuales pueden actuar como canales o poros para permitir el pasaje de pequeñas moléculas (Clavijo, 2014 y Ortega-Ferrusola, 2011).

Los espermatozoides equinos son células aplanadas y en forma de paleta con dimensiones de aproximadamente 60-65 μm de longitud total; longitud de la cabeza, 6–7 μm ; longitud de la pieza media, 10 μm ; longitud de la pieza principal, 40 μm ;

longitud de la pieza final, 4–5 μm . El ancho de la cabeza del espermatozoide es de aproximadamente 3.5–4.0 μm en el segmento ecuatorial del acrosoma, la dimensión más ancha de la célula (Meyers, 2009).

El acrosoma se encuentra entre la membrana plasmática en la región anterior de la cabeza y la envoltura nuclear, esta cuenta con su propio conjunto de membranas: la membrana acrosómica interna y la membrana acrosómicas externa, que se superpone a la membrana plasmática, la cual se fusiona con esta estructura en la reacción acrosómica (Meyers, 2009).

El núcleo de los espermatozoides consiste en cromatina que contiene ADN genómico, que está densamente empaquetado y estrechamente asociado con las principales proteínas nucleares conocidas como protaminas (Meyers, 2009).

El flagelo, es la cola del espermatozoide, comprende cuatro regiones, que son: el cuello, pieza central, pieza principal y pieza final. El flagelo proporciona movilidad a través del tracto reproductor genital de la yegua (Meyers, 2009).

El cuello contiene varias estructuras especializadas, específicamente columnas segmentadas y el capítulo. En los espermatozoides del equino, la fosa de implantación puede estar descentrada, lo que da como resultado una fijación de la cola abaxial, esto se considera normal para esta especie, con tal implantación de la cola estos tienen a nadar en movimientos circulares amplios (Meyers, 2009).

2.4 La espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de producción de espermatozoides en el epitelio seminífero durante el cual las células madre espermatogonias generan espermatozoides, que se diferencian, multiplican y generan espermatozoides. Este proceso ocurre dentro los túbulos seminíferos que son el componente principal del parénquima testicular de los testículos del semental equino (Meyers, 2009).

La espermatogénesis consta de tres fases de desarrollo: espermatocitogénesis (divisiones mitóticas de espermatogonias), meiosis y espermiogénesis (maduración y diferenciación de espermáticas). Las tres fases corresponden a duraciones de aproximadamente 19.4, 19.4 y 18.6 días, respectivamente, lo que lleva a una duración total de la espermatogénesis en sementales de aproximadamente 57-58 días (Meyers, 2009).

2.5 Capacitación espermática

Durante la capacitación el espermatozoide sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales hasta llegar a adquirir habilidad de fecundar el ovocito. En esta capacitación ocurre la pérdida de proteínas que envuelven el espermatozoide proveniente del plasma seminal (Ortega-Ferrusola, 2011).

En la naturaleza, esto ocurre en el tracto reproductivo de la hembra, pero la capacitación puede ocurrir in vivo (Meyers, 2009). La albúmina y lipoproteínas de alta densidad presentes en medios de cultivo o en el tracto reproductivo de la yegua,

extraen el colesterol de la membrana del espermatozoide aumentando su fluidez y haciéndola permeable a iones (Ortega-Ferrusola, 2011). Posteriormente ocurre aumento de calcio intracelular, bicarbonato y peróxido de hidrógeno, que colectivamente activan la adenil ciclasa para producir AMP cíclico, luego este a la proteína kinasa A que a su vez comienza a fosforilar una serie de proteínas (Meyers, 2009).

2.6 La reacción acrosómica

La reacción acrosómica consiste en un proceso de exocitosis mediante el que se liberan enzimas hidrolíticas presentes en el acrosoma. Estas enzimas degradan la zona pelúcida del ovocito, permitiendo junto con la hiperactivación espermática la unión del ADN del espermatozoide con el gameto femenino (Ortega-Ferrusola, 2011).

La reacción acrosómica puede ocurrir solo después de completarse la capacitación y puede ser inducida in vitro, por una serie de agentes químicos y biológicos, incluidas las proteínas de la zona pelúcida, ionóforos de calcio, glicosoaminoglicanos y progesterona (Meyers, 2009).

2.7 Factores que afectan la criopreservación de semen equino:

Los daños que sufren los espermatozoides durante la criopreservación son ocasionados por cambios de temperatura (estrés térmico), cambios de osmoralidad (estrés osmótico) o por la adición de agentes oxidantes (estrés oxidativo) (Gutiérrez-Cepeda, 2014). Además, una serie de cambios inducidos durante el procesamiento y

almacenamiento de los espermatozoides equinos también parecen inducir cambios de tipo apoptótico (Ball, 2008).

2.8 Estrés osmótico

Los espermatozoides sufren daño osmótico al inicio del proceso de criopreservación cuando los espermatozoides se diluyen en el medio de congelación, el cual es hiperosmótico, posteriormente durante la descongelación se produce un shock hipo osmótico debido a que el medio recupera su osmolaridad inicial y los espermatozoides recuperan su volumen (Ortega-Ferrusola, 2009; Gutiérrez, 2014).

Las técnicas modernas de evaluación de semen han demostrado que no se produce la formación de cristales intracelulares en los espermatozoides equinos, con las tazas de congelación utilizadas recientemente. Por lo tanto, el daño principal durante la criopreservación parece venir de un estrés físico-osmótico resultante de la formación de cristales extracelulares (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

2.9 Estrés térmico

Durante el proceso de criopreservación, ocurren cambios bruscos de temperatura que producen alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides, afectando principalmente a la membrana plasmática y la membrana acrosomal (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

Los lípidos de la membrana plasmática sufren una transición del estado líquido a fase de gel, alterándose su organización y por consiguiente su integridad y funcionalidad

(Ortega-Ferrusola, 2009 y Gutiérrez-Cepeda, 2014). También se produce una alteración en la distribución y funcionalidad de las proteínas de la membrana plasmática y el citoesqueleto (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

Se ha comprobado que la membrana plasmática de los espermatozoides equinos descongelados es menos fluida y más rígida que las de los espermatozoides frescos (Ortega-Ferrusola, 2009 y Gutiérrez-Cepeda, 2014).

2.10 Estrés oxidativo

En el metabolismo oxidativo fisiológico de los espermatozoides se producen especies reactivas al oxígeno (EROs) o radicales libres, los cuales desempeñan un papel importante en capacitación espermática, reacción acrosómica, el mantenimiento de la capacidad fecundante entre otros. No obstante, cuando se produce un desequilibrio en la producción y degradación de estas sustancias, ocurren afectaciones sobre la membrana plasmática, el ADN o la motilidad (Ball, 2008 y Gutiérrez-Cepeda, 2014).

2.11 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, desencadenada a través de la vía extrínseca, iniciada por receptores de la familia del factor de necrosis tumoral o la vía intrínseca, activada en las células que presentan alteraciones en su homeostasis, resultado de un estrés térmico, hipoxia, EROs entre otros. No solo es un proceso patológico, sino que también es un proceso fisiológico para eliminar espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

2.12 Procedimientos para la criopreservación de semen equino

2.12.0 Colecta de semen

La colecta de semen de alta calidad es un procedimiento muy importante en los programas de preservación de semen e inseminación artificial, por esta razón es importante realizar este procedimiento correctamente (Hurten, 2009).

El lugar donde se colecta el eyaculado debe ser un área espaciosa, sin obstáculos, limpia y libre de cualquier distracción para el caballo ya que algunos sementales tienen comportamientos violentos durante la cópula. La disponibilidad de espacio es muy importante para garantizar la seguridad del personal, de la yegua y del propio animal (Clavijo, 2015).

Entre métodos de colecta de semen en equinos, se pueden mencionar el uso de un condón, eyaculación inducida farmacológicamente, manipulación manual del pene, sin embargo, el método más empleado es el uso de una vagina artificial (Hurten, 2009).

La vagina artificial (VA) es un instrumento que intenta reproducir las condiciones naturales de la vagina de la yegua (temperatura, presión y lubricación) para estimular en el macho la eyaculación cuando se introduce el pene en ésta. Consiste en un cilindro rígido o flexible con una cubierta exterior dura o firme (normalmente látex) y una cubierta suave interior (Clavijo, 2015). Las VA están equipadas con una cámara que se le adiciona agua a temperatura entre 44 °C a 48 °C, la cual según su volumen modifica el diámetro interno de la vagina artificial (Hurten, 2009).

Los modelos de vagina artificial para equinos más comunes son: vagina artificial Missouri, Colorado, Hannover, Nishikawa, Harvet y Polaco (Clavijo, 2015; Hurten, 2009).

2.13 Evaluación seminal

El objetivo general de la evaluación de semen es estimar las perspectivas de fertilidad de los sementales equinos, evaluando muestras de semen individuales, como lo son eyaculados o dosis de semen (fresco, refrigerado, congelado y descongelado), como también determinar si los parámetros espermáticos cuantitativos y cualitativos, cumplen con los requisitos mínimos establecidos, para la composición biológica del semen equino (Sieme, 2009).

Los sementales equinos son evaluados como parte de la evaluación clínica de fertilidad, antes de una venta, al principio o al final de una temporada de reproducción (Jasko, 1992), identificando así, sementales fértiles y subfértiles (Brito, 2007). Ya que estas evaluaciones solo brindan una evaluación cruda sobre la fertilidad de los sementales (Sieme, 2009). Sin embargo, se han reportado altas correlaciones entre fertilidad y diferentes parámetros de calidad seminal como la motilidad y la morfología espermática (Love, 2011 y Restrepo *et al.*, 2013).

Se ha aceptado que un examen físico completo y una evaluación del semen equino, proporcionan una información casi real de su fertilidad, sin embargo, aunque la mala calidad del semen es un buen indicador de subfertilidad, la buena calidad del semen

(en términos de motilidad y normalidad de los espermatozoides) no garantizan una fertilidad aceptable (Colenbrander *et al.*, 2003). Los verdaderos indicadores de la fertilidad del semental son las tasas de gestación y natalidad, pero ambos son retrospectivos y están influenciados por factores independientes de la fertilidad del caballo, como son la fertilidad de la hembra y el manejo reproductivo (Colenbrander *et al.*, 2003 y Gutiérrez-Cepeda, 2014).

En la evaluación del semen, se determina: la concentración de espermatozoides por ml, la motilidad (total y progresiva), el volumen (con gel y sin gel), el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, el porcentaje de espermatozoides morfológicos normales y el pH seminal (Sieme, 2009 y McCue, 2014).

Los eyaculados obtenidos con una vagina artificial deben manejarse evitando daños a los espermatozoides, evitando fluctuaciones rápidas de temperatura y exposición a la luz solar, todo el equipo que tenga contacto con el semen debe mantenerse a una temperatura de 37 °C, realizando las evaluaciones de manera rápida y sistemática (Jasko, 1992).

a). Evaluación del color y aspecto del eyaculado

La apariencia macroscópica del eyaculado depende de su densidad la cual está determinada por la concentración de esperma, la composición del plasma seminal y los constituyentes fisiológicos (células epiteliales) o patológicos (orina o sangre). Las características seminales incluyen fluidez, consistencia y color. El color de la muestra de semen debe ser blanco lechoso, uniformemente turbio sin olor inusual, la

consistencia varía según la concentración de los espermatozoides, desde cremosos, lácteos (parecido al suero), hasta acuosos (Sieme, 2009).

b). Evaluación de volumen espermático

Las medidas más precisas se obtienen en un cilindro graduado después de la colecta seminal, la fase gelatinosa producida por las glándulas vesiculares a menudo se elimina utilizando un filtro en la vagina artificial (Jasko, 1992). El volumen total del eyaculado debe ser de 60 a 120 ml y el volumen sin gel de 30 a 100 ml, estas cifras son muy variables entre sementales y la frecuencia de recolección. El volumen del eyaculado depende de la raza, la edad y factores ambientales (alimentación, alojamiento, época del año, el método y frecuencia de recolección). (Sieme, 2009).

c). Evaluación de la concentración espermática

La concentración o densidad representa el número de espermatozoides por unidad de volumen, se representa habitualmente en millones por ml, concentraciones de 100 a 350 millones por ml son comunes y cuando las colectas son regulares de 50 a 150 millones por ml (Sieme, 2009). La concentración puede contarse manualmente usando un hemocitómetro o estimado usando un espectrofotómetro calibrado comercial o contador celular (McCue, 2014).

El hemocitómetro se considera el método más preciso para medir la concentración de los espermatozoides, las alícuotas definidas de la muestra de esperma se disuelven y se inmovilizan en una solución de formol/NaCl al 10%, después de agitar suavemente se cargan las cámaras del hemocitómetro, según la sedimentación, los espermatozoides se cuentan microscópicamente en un total de 10 cuadros en dos

campos de cámara. Dependiendo del volumen de la muestra de esperma, las variables fijas para altura y el volumen de cámara del hemocitómetro, se puede calcular la concentración del esperma resultante (Sieme, 2009).

El espectrofotómetro determina la densidad óptica de la muestra, por lo tanto, la presencia de escombros afectará la densidad óptica de la muestra, además su calibración debe hacerse anualmente, la dilución de una alícuota de semen bien mezclado 1:20 con solución salina tamponada es apropiado para los eyaculados antes de hacer un análisis espectrofotométrico (Jasko, 1992).

Utilizar contadores celulares electrónicos como el Núcleo Counter SP-100®, permite obtener resultados más exactos y repetibles que los obtenidos con la fotometría (Gutiérrez-Cepeda, 2014). Este equipo utiliza yoduro de Propidio (PI) el cual se une al ADN y permite calcular la concentración por fluorocromometría, exponiendo previamente los espermatozoides a un detergente (pH, bajo) se puede evaluar la viabilidad de los espermatozoides (Love, 2016).

La tecnología de análisis de semen asistido por computadora (CASA: computer assisted sperm analysis) determina la concentración a través de un software informático conectado a un microscopio, se recomienda el uso de cámaras con volúmenes fijados que permitan el conteo de una muestra de una sola capa de espermatozoides (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

d). Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad total es una estimación del porcentaje de esperma que muestra cualquier movimiento, y la motilidad progresiva incluye solo aquellos espermatozoides que están

avanzando activamente o se mueven en grandes caminos circulares (Ball, 2008), la cual, está asociada a la fertilidad y se considera un parámetro fundamental para la determinación de la capacidad fecundante de los espermatozoides a pesar de que no se ha correlacionado directamente con la fertilidad (Gutiérrez-Cepeda, 2014).

La motilidad del semen crudo, puede ser difícil de evaluar con precisión, ya que la concentración es a menudo demasiado alta para examinar los espermatozoides individualmente, debido a que estos tienden a aglutinarse dificultando su movimiento individual (Sieme, 2009 y McCue, 2014), en consecuencia se ha abogado por la dilución de semen 1:2 en un extensor de leche descremada antes de la evaluación (Jasko, 1992) o en una dilución con una concentración de 25 millones de espermatozoides por ml (Ball, 2008; Varner, 2008; Sieme, 2009 y McCue, 2014).

La motilidad de los espermatozoides se evalúa en un microscopio de contraste de fase con un aumento final de 200X a 400X, equipado con una platina cálida a 37°C, utilizando cubre objetos y porta objetos precalentados (Jasko, 1992; Katila, 2001; Ball, 2008 y Love, 2016). Se recomienda una profundidad de campo de visión entre 10 a 20 μm , el cual se logra colocando una gota de 6 a 10 μL de semen en el portaobjetos y colocando un cubreobjetos de 18 a 20 mm^2 sobre la gota, múltiples campos deben observarse en al menos dos suspensiones, tomando en cuenta que la motilidad en los bordes del cubreobjetos disminuye más rápidamente que en el centro debido al secado por la exposición al aire (Jasko, 1992).

El análisis de semen computarizado (CASA), analiza el movimiento del esperma, mediante imágenes de video, obtenidas en la observación de campos microscópicos de esperma móvil (Jasko, 1992). CASA ofrece un medio más confiable para evaluar objetivamente los parámetros del esperma como la motilidad, concentración y los nuevos módulos incluyen análisis de morfología, aunque limitados a la morfología de la cabeza del esperma (Sieme, 2009). Sin embargo, para los parámetros de concentración y morfología no son tan precisos como los métodos de análisis tradicionales (Dascanio, 2014).

Los primeros sistemas CASA disponibles fueron el Analizador Automático de Semen CellSoft (1985) y el Analizador de Motilidad Hamilton Thorn (HTM) (1986) (Katila, 2001) hoy en día existen otros en el mercado como el Sperm Visión de MiniTube (Sieme, 2009). Debido al alto costo del instrumento, los sistemas computarizados de análisis de imágenes de esperma se utilizan principalmente para aplicaciones de investigación (Katila, 2001).

Las imágenes de video para el análisis computarizado del movimiento de los espermatozoides se obtienen a partir de la visualización de campos de espermatozoides móviles utilizando un microscopio. Se analiza un número establecido (generalmente de 20 a 30) de cuadros de video sucesivos a una velocidad constante, típicamente de 30 a 60 cuadros por segundo. Cuando se han analizado todos los marcos para un campo determinado, se utilizan algoritmos informáticos para distinguir los espermatozoides de los objetos que no son espermatozoides y para reconstruir las

pistas de esperma, cada esperma se clasifica como móvil o no móvil, y se calcula la concentración de ambos (Katila, 2001 y Sieme, 2009).

Para un análisis CASA, se recomienda concentraciones de semen de 12 a 30 X10⁶/ml, ya que altas concentraciones dificultan el análisis individual exitoso del esperma, el extensor donde se diluye el semen no debe contener partículas de un tamaño similar al de la cabeza del esperma, por que dificultaría la diferenciación del esperma no móvil, el cual podría ser de glucosa o de leche descremada (Jasko, 1992). Además, se recomienda un portaobjetos de microscopio especial para su uso en el sistema CASA que tiene un volumen predefinido (cámara de 10 o 20 µm de profundidad) Dascanio (2014).

Los parámetros de motilidad determinados por CASA son, motilidad total (MOT), motilidad progresiva (PMOT), velocidad media en línea recta (VSL), velocidad curvilínea media (VCL), velocidad media de trayectoria (VAP), la rectitud (STR=VSL/VAP), linealidad (LN=VSL/VCL) el desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia cruzada de latidos (Katila, 2001 y Sieme, 2009).

e). Evaluación de la morfología espermática

La morfología espermática tiene un gran impacto en la fertilidad de las especies domésticas incluyendo los caballos, aunque un análisis de esta no pueda justificar que la fertilidad de un eyaculado es alta, es razonable decir que la fertilidad es baja cuando una proporción de espermatozoides tiene anomalías. Debe tenerse en cuenta que

la morfología espermática no es más ni menos importante que la motilidad del esperma (Brito, 2007).

Los espermatozoides deben clasificarse por las siguientes características morfológicas: espermatozoides normales, cabezas anormales, cabezas separadas, gotas proximales, gotas distales, pieza intermedia anormal, colas dobladas y presencia de células germinales u otras como eritrocitos y leucocitos (Jasko, 1992; Brito, 2007; Sieme, 2009 y Love, 2016).

La morfología de los espermatozoides se puede evaluar examinando frotis teñidos bajo microscopio óptico de campo brillante (aumento de 1000X) (Varner, 2008 y Sieme 2009). Se pueden utilizar manchas específicas de esperma como las desarrolladas por (Williams, 1950) o (Casarett, 1953), tinciones celulares generales (Wright's, Giemsa, hematoxilina-Eosina) como también tinciones de fondo (Eosina-Nigrosina) (Varner, 2008 y Gutiérrez-Cepeda, 2014).

La más utilizada es la tinción Eosina-Nigrosina, por su fácil aplicación y eficacia. Por ser una mancha viva-muerta permite la evaluación de la integridad de la membrana al mismo tiempo que la morfología (Sieme 2009 y Gutiérrez-Cepeda, 2014). Esta mancha no penetra las células con membranas intactas, por lo tanto, los espermatozoides no teñidos tienen membranas intactas (vivos) y aquellos teñidos tienen membranas alteradas (muertos) (Katila, 2001 y Brito, 2007). En general, se recomienda examinar más de 100 células, para determinar una representación válida de anomalías (Brito, 2007; Ball, 2008; Sieme, 2009 y Cecere, 2014).

Para su utilización se debe incubar la muestra de semen a 37°C durante cinco minutos y colocar 10µl de la misma y 10µl de la tinción sobre el extremo de un portaobjetos, homogenizando ambas gotas y realizando una extensión con el canto de otro portaobjetos (Gutiérrez-Cepeda, 2014). La formulación de Nigrosina-Eosina se prepara disolviendo 5% p/v de Nigrosina, 0.6% p/v de Eosina, 3% p/v de citrato de sodio-dihidrato en agua, el pH de la mancha se ajusta a 7.0 y se pasa a través de un papel de filtro (Sieme, 2009).

Las características morfológicas de los espermatozoides se pueden evaluar sin teñir en suspensiones de solución salina de formol tamponado, utilizando un microscopio de contraste de fase (Jasko, 1992 y Sieme 2009) esta técnica de montaje húmedo se prepara fijando en relación 1:4 los espermatozoides en solución salina de formol tamponado, este método permite una visualización de los defectos del espermatozoide y la integridad acrosomal, con el requisito de un aumento de 1000X en el microscopio de contraste de fase (Brito, 2007 y Sieme 2009).

2.14 Dilución de semen

La dilución del semen es un procedimiento de uso común en muchas especies para permitir una evaluación más precisa de la calidad del espermatozoide y mejorar la longevidad del espermatozoide. La dilución es particularmente importante para el almacenamiento de semen equino, debido al uso comercial de semen enviado en frío y congelado (Hayden *et al.*, 2015).

Previamente a una centrifugación seminal convencional o amortiguadora, el semen debe diluirse en proporción 1:1 en un diluyente a base de leche desnatada (Alvarenga *et al.*, 2016). Cuando se trabaja con mucha concentración de semen, se recomienda realizar diluciones mayores (2: 1) para reducir el daño y pérdida de espermatozoides durante la extracción de plasma seminal. El diluyente debe ser agregado al semen y debe precalentarse a 37 ° C para evitar el choque frío (Alvarenga *et al.*, 2016).

Los diluyentes comerciales a base de leche desnatada o caseína proporcionan los nutrientes necesarios para el metabolismo de los espermatozoides, mantienen un control del pH y la osmolaridad, como también protegen a la membrana contra el choque por frío y daño oxidativo. Además, contienen antibióticos que previenen el crecimiento de bacterias frío (Alvarenga *et al.*, 2016).

2.16 Centrifugación seminal

La centrifugación es una técnica de procesamiento que se puede utilizar si un eyaculado tiene una concentración inicial baja (menos de 100 millones de espermatozoides / ml) o si el plasma seminal del semental tiene un efecto perjudicial sobre la viabilidad de los espermatozoides (Bradecamp, 2014a). La centrifugación también se utiliza cuando se procesa semen para congelar o para extraer plasma seminal (Alvarenga *et al.*, 2012; Bradecamp, 2014a).

El plasma seminal (PS), además de transportar y nutrir las células espermáticas, este fluido participa en el proceso de capacitación de los espermatozoides, Aunque PS

contiene sustancias que estimulan y protegen los espermatozoides, su composición puede ser beneficiosa o perjudicial para la calidad seminal (Alvarenga *et al.*, 2012). Puede tener beneficios para los sementales cuyos eyaculados sufren una reducción excesiva de la motilidad progresiva (MP) de los espermatozoides cuando se procesan de manera convencional (Brinsko *et al.*, 2000).

La eliminación de la mayor parte del plasma seminal ayuda a eliminar sus efectos perjudiciales sobre la supervivencia de los espermatozoides durante la congelación, Aunque se ha adicionado PS a los gránulos de esperma luego de la centrifugación sin reducir significativamente los porcentajes de espermatozoides móviles o viables después de la criopreservación considerando apropiado el 5% al 20% de plasma seminal (Loomis, 2006) no obstante Alvarenga *et al.*, (2012) recomienda menos del 5%.

Estudios abogan que el plasma seminal, puede ser necesario para el transporte adecuado de esperma en el útero, para la preparación del endometrio antes de la implantación del conceptus o para reducir la endometritis después la inseminación (Morrell *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos factores es ventajoso dejar aproximadamente 5–10% del plasma seminal con el sedimento de esperma (Bradecamp, 2014a).

La fuerza y el tiempo de centrifugación pueden tener un impacto negativo en la motilidad, integridad y recuperación de esperma. Las altas fuerzas centrífugas causan una fuerte adhesión del gránulo, que es perjudicial para espermatozoides, mientras

que las bajas fuerzas promueven la baja recuperación de los espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 2016), Incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación logran alterar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos (Restrepo *et al.*, 2016).

La mejor combinación de fuerza y tiempo para una buena tasa de recuperación de esperma y menos daño la calidad del esperma es de 600 g durante 10 minutos (Loomis, 2006; Alvarenga *et al.*, 2012; y Alvarenga *et al.*, 2016). Recuperando con esta fuerza y tiempo aproximadamente el 75% del esperma inicial (Loomis, 2006; Bradecamp, 2014a).

2.17 Centrifugación coloidal

Un método alternativo para eliminar el plasma seminal de la eyaculación con el objetivo de minimizar el daño de los espermatozoides es la técnica de centrifugación amortiguada. Este método intenta para maximizar la recuperación de esperma del semen equino centrifugado mediante el uso de alta fuerzas de centrifugación y prevención de daños con un líquido amortiguador colocado en la parte inferior del tubo de centrífuga (Alvarenga *et al.*, 2016).

La ventaja de utilizar un medio amortiguador es que se puede usar una fuerza *g* más alta (1000 *g* durante 20–25 minutos) con menos daño a los espermatozoides y mayores tasas de recuperación (95-100% de recuperación). Esto es especialmente útil cuando hay un bajo número de espermatozoides en la eyaculación, el medio

amortiguador se coloca debajo del semen extendido en un tubo cónico, el tubo se centrifuga y luego se extraen el sobrenadante y el amortiguador, dejando un concentrado pellet de semen en el tubo (Bradecamp, 2014b).

Los espermatozoides seleccionados por centrifugación de capa única través de una formulación específica de especie de sílice recubierta con glicidoxipropiltrimetoxisilano, Androcoll-E ®, brinda mejores resultados en términos de motilidad, integridad de la membrana espermática e integridad de la cromatina que la centrifugación sin coloide (Morrell *et al.*, 2010). Además, la centrifugación coloidal de capa única realizada con semen extendido o crudo reduce la fragmentación del ADN (Gutiérrez *et al.*, 2011), como también durante las primeras cuatro horas después de la descongelación (Gutiérrez *et al.*, 2012).

El uso de un gradiente de densidad (EquiPure™, Nidacon, International AB, Mölndal, Suecia), mejora la población en la selección espermática, independientemente del tiempo y la fuerza de gravedad utilizada durante la centrifugación (Méndez, 2015). Además, este producto comercial puede utilizarse para centrifugar altos volúmenes espermáticos en una sola capa obteniendo buenos resultados (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Los espermatozoides de seminal seleccionados por centrifugación coloidal muestran una mejor criosupervivencia que las muestras de esperma no procesadas por este método y pueden tener una supervivencia más larga después del deshielo, este último atributo también puede ser el resultado de la disminución de la producción de peróxido de hidrógeno en las muestras de esperma descongeladas (Morrell, 2017).

2.18 Congelación de semen

Después de la centrifugación seminal y la aspiración del sobrenadante, el diluyente de congelación se le agrega cuidadosamente al sedimento de semen (Brinsko, 2011). El semen equino generalmente se diluye a 200 a 400 millones de espermatozoides por ml, en un extensor de congelación y se envasa en pajuelas de 0.5 ml las cuales contienen un total de 100 a 200 millones de espermatozoides por pajuela (McCue, 2014) o de 50 a 100 millones de espermatozoides por pajuela (Brinsko, 2011).

Las pajillas deben identificarse con los datos pertinentes como la identificación del semental, raza, fecha de procesamiento de semen entre otros, las mismas deben sellarse antes del proceso de congelación dejando un espacio de aire en el centro de la pajuela para permitir la expansión del contenido congelado (Brinsko, 2011).

Existen dos técnicas para congelar semen equino, utilizando una caja de hielo seco o un congelador de células programable (Alvarenga *et al.*, 2016; McCue, 2014 y Brinsko, 2011). Estudios indican que no hay diferencias sobre la calidad del semen descongelado entre los dos métodos (Alvarenga *et al.*, 2016) sin embargo Brinsko, (2011) ha encontrado mejor viabilidad del semen descongelado utilizando un congelador programable además que este aparato permite manejar un mejor control del proceso.

El proceso de enfriamiento inicialmente consiste en llevar las muestras de semen hasta una temperatura de 5 °C, el tiempo varía de acuerdo con el extensor utilizado, en el caso del diluyente Botucurio® el tiempo recomendable son 20 minutos a 5 °C (Alvarenga *et al.*, 2016). No obstante, McCue, (2014) recomienda que las pajillas procesadas

utilizando un diluyente a base de leche descremada o yema de huevo pueden enfriarse hasta por 2 horas. Por otra parte, Brinsko, (2011) recomienda enfriar aquellas pajuelas procesadas con el crioprotector glicerol por 90 minutos. El semen extendido en diluyente a base de lactosa-EDTA no necesita ser enfriado antes de la congelación McCue, (2014).

El criógeno más común para la congelación de semen equino es el Nitrógeno líquido, inicialmente las pajuelas pueden colocarse horizontalmente en vapores de Nitrógeno de 1 a 4 cm por encima del Nitrógeno líquido (Brinsko, 2011) o de 3 a 6 cm (Alvarenga *et al.*, 2015); (McCue, 2014). Permita 10 minutos de equilibrio o hasta que la temperatura alcance los (-120°C). (McCue, 2014). Finalmente, las pajuelas se sumergen en Nitrógeno líquido a (-196) y se almacenan ordenadamente en tanques de almacenamiento (Brinsko, 2011).

2.19 Diluyentes utilizados en la criopreservación de semen equino

Generalmente los diluyentes utilizados para congelar semen equino están compuestos de sustancias para estabilizar el pH, neutralizar los productos tóxicos producidos por el metabolismo de los espermatozoides, proteger contra el choque térmico, mantener el equilibrio electrolítico y osmótico, inhibir el crecimiento de bacterias y suministro de energía. Los extensores también deben contener crioprotectores para prevenir la formación de hielo intracelular y extracelular (Alvarenga *et al.*, 2016).

Existen muchos diluyentes comercialmente disponibles, los más comunes son Lactosa EDTA (Animal Reproduction Systems, Chino, CA), congelación INRA (IMV) y BotuCrio (Botupharma) Alvarenga *et al.*, (2016).

Los agentes crioprotectores pueden clasificarse como penetrantes o no penetrantes y como intracelulares o extracelulares. Los agentes crioprotectores intracelulares actúan mediante su capacidad para unirse al agua o mediante sus propiedades coligativas (es decir, concentración de moléculas). Los agentes extracelulares protegen a los espermatozoides mediante el uso de efectos osmóticos para crear un ambiente hipertónico que induce el movimiento del agua fuera de las células, deshidratando los espermatozoides y reduciendo las posibilidades de que se formen cristales de hielo dentro de las células (Alvarenga *et al.*, 2016).

Los agentes crioprotectores no penetrantes son eficaces para proteger los espermatozoides durante la congelación sin penetrar en las células; los ejemplos incluyen yema de huevo, leche y ciertos azúcares. La yema protege a los espermatozoides del choque térmico porque está compuesta por lipoproteínas de baja densidad que se adhieren a la membrana celular durante la congelación, restaurando así los fosfolípidos perdidos en la membrana celular. Los diluyentes utilizados en la criopreservación de semen equino contienen entre un 2% y un 20% de yema de huevo (Alvarenga *et al.*, 2016).

2.20 Descongelación de semen

El semen congelado debe descongelarse inmediatamente antes de su uso, por lo general, las instrucciones de descongelación son proporcionadas por la persona o instalación que inicialmente congeló el semen. Por lo general, las pajuelas de semen de 0.5 ml se descongelan a 37 ° C durante 30 segundos (Dascanio, 2014), o a 75°C durante 7 segundos (Pineda & Pinilla, 2007). Como también se ha descongelado pajuelas de 0,5 ml en un baño de agua a 46 ° C durante 20 segundos (Brinsko, 2011).

Cochran *et al.*, (1984) compararon estas dos técnicas y obtuvieron un aumento de 4 al 5 % en la motilidad del semen descongelado mediante inmersión a 75 °C durante 7 segundos. Sin embargo, Borg *et al.*, en (1997) compararon la motilidad, morfología e integridad de la membrana plasmática del semen descongelado mediante estos dos métodos y no encontraron diferencias en estos parámetros, excepto en el porcentaje de espermatozoides vivos, el cual fue superior tras descongelar a 37°C por 30 segundos.

Los parámetros aceptables para la calidad del semen posdescongelación son más del 50% de la motilidad total, más del 30% de la motilidad progresiva y tasas de fertilidad esperadas de 40% a 60% por ciclo (Alvarenga *et al.*, 2016).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar los resultados de dos protocolos de criopreservación de semen equino, sobre los parámetros de calidad de semen centrifugado y descongelado.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar y comparar el porcentaje de sobrevivencia de espermatozoides poscentrifugación y posdescongelación en los protocolos empleados.
- Evaluar y comparar la motilidad progresiva de los espermatozoides poscentrifugación y posdescongelación en los protocolos empleados.
- Evaluar y comparar el vigor de los espermatozoides poscentrifugación y posdescongelación en los protocolos empleados.

IV HIPÓTESIS

Ha

Existen diferencias entre los protocolos de criopreservación de semen a evaluar, en cuanto a la tasa de sobrevivencia, motilidad, mortalidad y vigor de los espermatozoides.

Ho

No existen diferencias entre los protocolos de criopreservación de semen a evaluar, en cuanto a la tasa de sobrevivencia, motilidad, mortalidad y vigor de los espermatozoides.

V MARCO METODOLÓGICO

5.1 Lugar de estudio

Este estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Biotecnología Agropecuaria, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá. Ubicado en el corregimiento de Chiriquí, localizado a los 8'23'15.12" de latitud norte y 82°19'47.48" de longitud oeste. Con una elevación de 26 msnm. Dicho centro se encuentra ubicado dentro de la zona climática tropical de sabana, con una temperatura máxima promedio de 32.0 °C y mínima promedio de 22.1 °C. Una precipitación pluvial anual con promedio de 2 856.9 mm y una humedad relativa de 80%.

5.2 Animales experimentales

Se utilizaron 2 sementales de la raza Cuarto de Milla, en edades entre 8 a 10 años. La condición corporal de estos sementales en promedio era aproximadamente entre 6 y 7 (en escala de 1-9) Henneke *et al.*, (1983). En este proyecto se criopreservarán 3 eyaculados por cada semental (6 en total), de manera que cada eyaculado fue criopreservado empleando dos métodos de centrifugación, 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos.

Figura 1: Animales experimentales.



5.3 Colecta del semen

Para realizar las colectas de semen equino, se utilizó una VA modelo colorado (Bothuparma ®), la misma se armó según las instrucciones del fabricante, se le adicionó agua a una temperatura de 50°C en la cámara interior y se le colocó gel no espermicida sobre el reborde interior. Para la colecta de semen propiamente, se utilizó una yegua en celo con la cola vendada. El pene fue desviado hasta el interior de la vagina artificial, manteniéndola ligeramente hacia afuera hasta lograr la eyaculación de los caballos. El semen se depositó en el recipiente colector de la vagina artificial y se procedió a llevarlo al laboratorio.

5.4 Análisis de semen crudo

Se evaluaron las características macroscópicas de cada eyaculado (color, volumen, consistencia) y las características microscópicas bajo visión microscópica: motilidad progresiva, concentración y vigor. Para evaluar la motilidad progresiva, se diluyó una alícuota de semen 1:2 en el diluyente a base de caseína y colesterol (Botusemen Gold ® Bothuparma).

5.5 Dilución del semen

El semen recién colectado se diluyó en proporción 1:1 en el diluyente (Botusemen Gold ® Bothuparma), previamente precalentado a 37 °C y se mantuvo a esta temperatura en una platina térmica, contenido en tubos de 15 ml para su posterior centrifugación.

5.6 Centrifugación de semen

El semen diluido fue centrifugado bajo dos fuerzas de la siguiente manera: 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos, se obtuvo un pellet de espermatozoides en el fondo de cada tubo y el sobrenadante fue retirado con ayuda de una pipeta Pasteur, luego el pellet de espermatozoides fue resuspendido en un determinado volumen de diluyente de congelación Botucio ®.

5.7 Envasado del semen

El semen fue envasado en pajuelas 0.5 ml, previamente tituladas según el método de centrifugación seminal (600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos) utilizado anteriormente, para facilitar identificación y análisis de estas en el proceso de descongelación de semen.

5.8 Análisis de semen centrifugado

El semen diluido con el diluyente Botucio® fue evaluado bajo visión microscópica, registrando parámetros seminales como la motilidad progresiva, el vigor y los espermatozoides vivos y muertos.

5.9 Enfriamiento y congelación de semen

Las pajuelas fueron enfriadas por 30 minutos a una temperatura de 5 °C y luego fueron expuestas en vapores de nitrógeno a 3 cm por encima del nitrógeno líquido por 17 minutos. Seguidamente fueron sumergidas en Nitrógeno líquido y almacenadas ordenadamente en un tanque de almacenamiento.

5.10 Descongelación de semen

Las pajuelas fueron descongeladas en baño maría a una temperatura de 37 °C por 30 segundos, luego se depositaron en un microtubo y fueron analizados bajo visión microscópica, registrando los parámetros seminales de semen descongelado (Motilidad progresiva, vigor y los espermatozoides vivos y muertos).

5.11 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con 3 réplicas bloqueando por caballos, con la intención de controlar la posible variabilidad entre los sementales equinos. Los tratamientos se organizaron en base a un arreglo factorial 2 por 2 con el propósito de evaluar y comparar los parámetros seminales entre los tratamientos estudiados poscentrifugación y posdescongelación.

Los factores para considerar en el diseño son los siguientes: fuerza centrífuga (600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos), y estado del semen (semen centrifugado, semen descongelado). Los factores fueron ordenados de la siguiente manera: semen centrifugado a 600 g por 11 minutos, semen centrifugado a 750 g por 8 minutos, semen

descongelado, centrifugado a 600 g por 11 minutos y semen descongelado centrifugado a 750 g por 8 minutos, para los tratamientos 1,2,3 y 4 respectivamente, como se aprecia en la tabla N°1.

Los resultados fueron analizados mediante un modelo lineal general (GLM) para cada uno de los parámetros seminales, las medias para cada tratamiento fueron comparadas por la prueba de Tukey, todos los datos fueron analizados utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión: 28.0.0.0 (190).

Tabla 1: Arreglo factorial 2x2.

Fuerza centrífuga	Semen centrifugado	Semen descongelado
600 g 11 min	T1	T3
750 g 8 min	T2	T4

5.12 Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + R_k + (TBR)_{ijk} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = Variable Dependiente

μ = Efecto de la media

T_i = Efecto de tratamiento

B_j = Efecto de bloque

R_k = Efecto de la réplica

$(TBR)_{ijk}$ = Efecto de la interacción

e_{ijk} = Efecto del error experimental

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los parámetros seminales del semen fresco en los dos caballos evaluados se resumen en la tabla dos.

Tabla 2: Parámetros seminales de semen fresco previos al proceso de criopreservación.

Parámetro seminal	Media \pm Desviación estándar
Motilidad progresiva (%)	60 \pm 6.3
Vigor espermático (1-5)	3.33 \pm 0.4
Concentración de esperma (mill/ml)	391.67 \pm 66.46
Volumen de semen sin gel (ml)	110.83 \pm 10.21
Espermatozoides vivos (%)	78.33 \pm 14.72

Dentro de las características seminales del semen fresco, se observó un color blanco grisáceo, una consistencia acuosa y un olor normal característico del semen.

Estos parámetros seminales son aptos para el proceso de congelación según lo recomendado por (Gutiérrez-Cepeda 2014 & Restrepo 2014), quienes coinciden que el semen fresco para congelación debe tener una motilidad progresiva superior al 60 % y una concentración arriba de 100 millones por ml. Con respecto al vigor espermático (Alvarenga *et al.*, 2014) recomiendan un vigor mayor o igual a 3.

6.1 Resultados y discusión de la motilidad progresiva (MP)

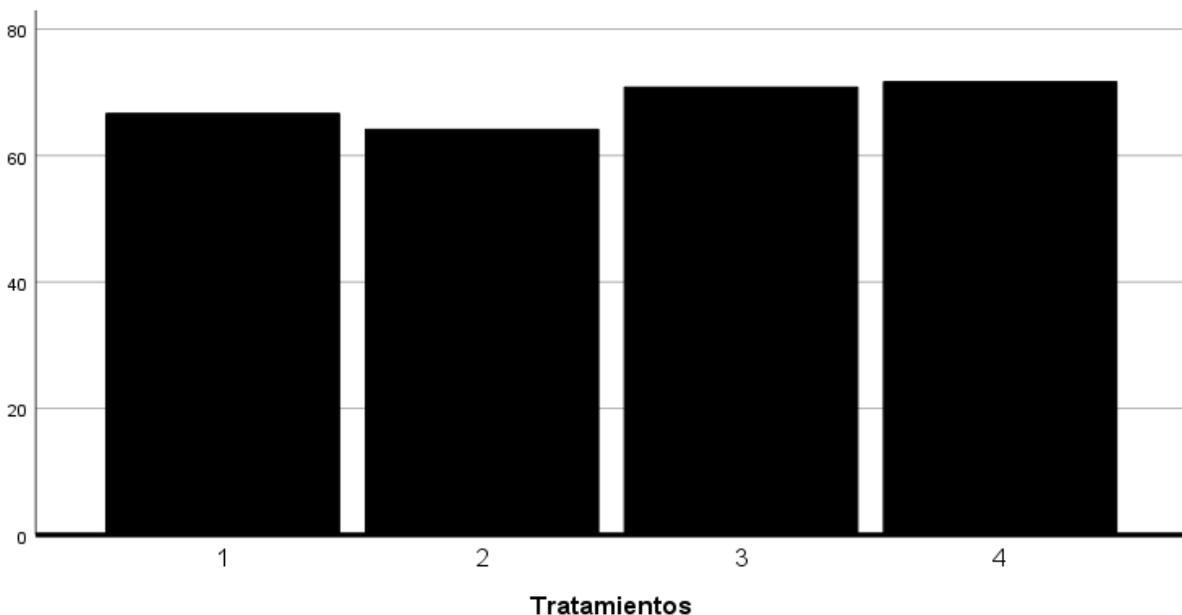
El análisis de varianza de MP no reveló diferencias significativas ($P > 0.05$) en los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Esto indica que no existen diferencias entre los métodos de centrifugación seminal estudiados T1 (600 g por 11 minutos) y T2 (750 g por 8 minutos) en cuanto a la MP en el semen poscentrifugación resuspendido en Botucurio®.

Por otra parte, tampoco existen diferencias significativas entre los tratamientos T3 (semen descongelado, centrifugado a 600 g por 11 minutos) y el T4 (semen descongelado, centrifugado a 750 g por 8 minutos) en cuanto a la MP del semen descongelado, no obstante, se observa un aumento de la MP en el semen descongelado con respecto a la del semen poscentrifugación. Ver tabla tres.

Tabla 3: Valores promedio de motilidad progresiva obtenida en cada tratamiento.

Tratamientos	Motilidad progresiva (%) (Media y Desviación Estándart)
1	66.67±8.16 ^a
2	64.17±7.36 ^a
3	70.83±10.21 ^a
4	71.67±10.80 ^a

Figura 2: Porcentaje de motilidad progresiva (media) por tratamientos.



Los resultados de MP para semen poscentrifugación fueron de 66.67 ± 8.16 y 64.17 ± 7.36 para las fuerzas de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente, estos resultados no expresan diferencias estadísticas significativas, al respecto Gary y Dean (2009) y Restrepo *et al.*, (2016) utilizando fuerzas de centrifugación similares, reportan resultados inferiores de MP, no obstante, coinciden con nuestro trabajo al no encontrar diferencias significativas en cuanto a este parámetro seminal.

Un estudio de Riccio *et al.*, (2016) reportó resultados superiores (82%) de MP, utilizando una combinación de fuerza centrífuga y tiempo de 600 g por 10 minutos, el semen fue diluido en el diluyente INRA 96®, por otra parte, Camacho (2014) analizando el semen diluido en el mismo diluyente de congelación de nuestro estudio (Botucio®) con una combinación de fuerza centrífuga y tiempo de 600 g por 12 minutos, encontró 59 % de MP en la raza Criollo Colombiano.

Los parámetros de MP para el semen descongelado fueron 70.83 ± 10.21 y 71.67 ± 10.80 para fuerzas de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente, estos resultados no expresan diferencias estadísticas significativas, coincidiendo con nuestro trabajo Gary y Dean (2009) tampoco encontraron diferencias entre sus fuerzas de centrifugación empleadas, en cuanto a la MP, no obstante, sus resultados son muchísimos más bajos, no mayores al 25%.

Los parámetros de MP para el semen descongelado demuestran un ligero aumento luego de la descongelación, al respecto no se ha encontrado investigaciones que

reporten resultados similares, incluso Méndez (2011) no reporta resultados superiores al 30 % utilizando CC. No obstante Ribeiro *et al.*, (2015) ha encontrado una media de MP de 42 % en semen descongelado de caballos muy fértiles frente a caballos poco fértiles, los cuales revelaron una media de MP del 27%.

Resultados similares encontrados en sementales fértiles antes mencionados, reportó Aürich (2020) luego de haber analizado datos provenientes de muchos sementales, encontrando en la raza Cuarto de Milla $41 \pm 17\%$ de MP y $47 \pm 18\%$ de MP en la raza Árabe.

Resultados más cercanos a los nuestros encontró Sielhorst *et al.*, 2016. Estos investigadores reportan una MP de $62 \pm 9.3\%$ en la raza Hanoveriana utilizando una combinación de fuerza centrífuga y tiempo de 600 g por 10 minutos y el diluyente INRA82®.

Se ha demostrado que la centrifugación coloidal y la centrifugación estándar no demuestran diferencias significativas en cuanto a MP, como es el caso de Ecot *et al.*, (2020) comparado el efecto de la centrifugación coloidal en asociación con diferentes diluyentes (1000 g por 20 minutos) con la centrifugación convencional (600 g por 10 minutos) sobre los parámetros del semen descongelado, pero no encontraron diferencias en cuanto a la MP entre ambos métodos de centrifugación el cual fue de 28 % aproximadamente. Mari *et al.*, (2014) de igual manera no encontró diferencias entre CC y CE, para dicho parámetro seminal.

Aunque existe muchas diferencias entre razas y sementales en la respuesta al proceso de criopreservación de semen equino, se ha propuesto para garantizar la capacidad fecundante de los espermatozoides y viabilidad una MP mayor o igual al 35 % en el semen posdescongelación.

La discrepancia de nuestros resultados con otros estudios puede deberse a el efecto de la motilidad progresiva inicial del eyaculado, al efecto de los diluyentes usados y a la variabilidad entre razas y sementales. Alvarenga *et al.*, (2017) mencionan que los caballos de la raza Cuarto de Milla son capaces de tener mejores parámetros espermáticos que otras razas en el procesamiento de semen.

Al respecto Ortega-Ferrusola (2011) señala que esta variabilidad entre sementales incluso entre eyaculados de un mismo semental puede deberse a un componente genético y también lo relaciona con el crecimiento bacteriano en el semen.

Gutiérrez-Cepeda (2014) asegura que el diluyente Botucurio® demuestra superioridad al conservar los parámetros de motilidad del semen, al compararlos con otros diluyentes comerciales. A la misma conclusión llegaron Mascarenhas *et al.*, (2014), además aseguran que esa superioridad es altamente significativa para el caso de la MP.

Los diluyentes que contienen amidas proporcionan una mejora significativa en la motilidad, comparados con aquellos que contienen glicerol, no obstante, la asociación de ambos crioprotectores mejoran dichos parámetros, como es el caso del Botucurio®, que contiene una asociación de Methylformamida y glicerol (Alvarenga *et al.*, 2016).

El tiempo que transcurre entre la colecta y la centrifugación seminal, puede tener un efecto sobre la motilidad del semen descongelado. Ecot *et al.*, (2020) en este sentido reportaron una reducción significativa de la MP posdescongelación, 28% y 20% para un tiempo de 20 minutos y 200 minutos respectivamente.

Méndez (2015) reportó el efecto de la centrifugación coloidal sobre los parámetros de semen centrifugado utilizando las siguientes fuerzas (600 g por 20 minutos, 600 g por 30 minutos, 1000 g por 20 minutos y 1000 g por 30 minutos), sus resultados para MP fueron de 59.85 ± 13.1 , 59.30 ± 11.5 , 45.87 ± 14.2 , 49.02 ± 14.4 respectivamente y para semen descongelado 27.1 ± 1.2 , 30.2 ± 1.2 , 23.9 ± 1.2 , 27.1 ± 1.2 respectivamente.

Son necesarios estudios adicionales bajo las condiciones climáticas de este trabajo, para corroborar los buenos resultados que hemos obtenido en la raza Cuarto de Milla, sería interesante estudiar el efecto de estos protocolos en otras razas, utilizando técnicas modernas de evaluación de semen como el CASA, fotometría de flujo, entre otros.

6.2 Resultados y discusión del vigor espermático

En los resultados de vigor espermático no se encontraron diferencias significativas entre los T1 y T2. De la misma manera los tratamientos T3 y T4 no difirieron entre sí. No obstante, los tratamientos T1 y T2 revelaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los T3 y T4, estos resultados nos indican que la disminución del vigor espermático del semen, luego de ser congelado y descongelado es significativo, no

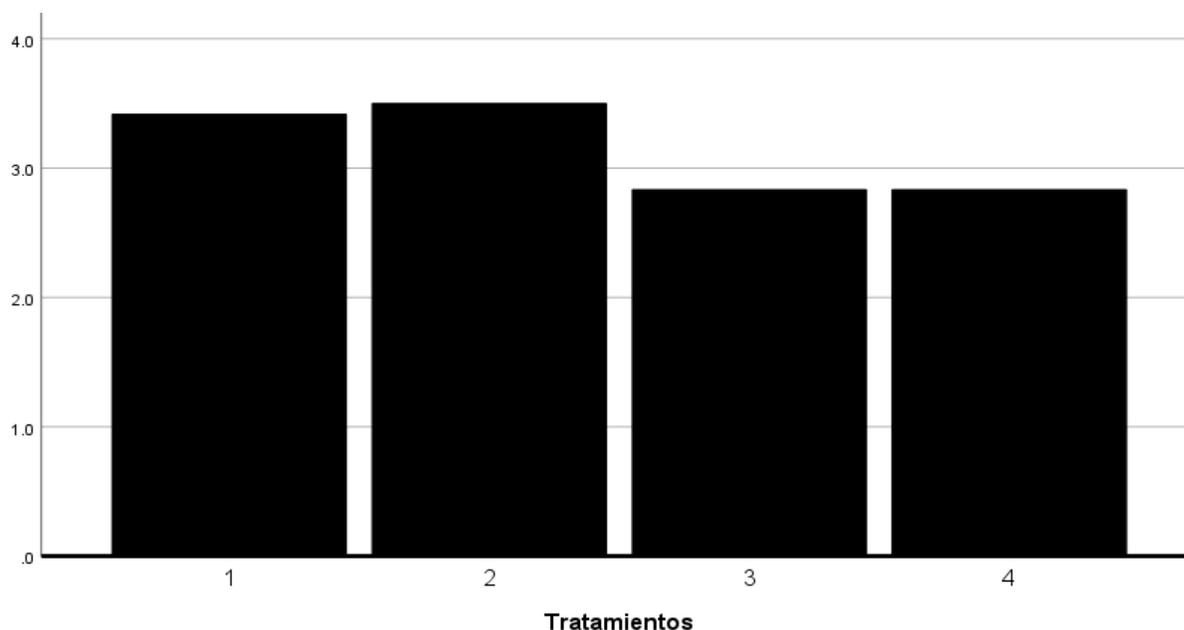
obstante, los valores promedio para ambos métodos de centrifugación son similares, en el semen descongelado, ver Tabla cuatro.

Tabla 4: Valores promedio del vigor espermático de los espermatozoides obtenidos en cada tratamiento.

Tratamientos	Vigor espermático (1-5) (Media y Desviación Estándart)
1	3.42±0.2^a
2	3.5 ±0.0^a
3	2.83±0.4^b
4	2.83±0.4^b

Diferentes letras subíndices indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Figura 3: Vigor espermático promedio obtenido en cada tratamiento.



Los resultados de vigor espermático para semen centrifugado fueron de 3.42 ± 0.2 y 3.5 ± 0.0 para las combinaciones de fuerza centrífuga y tiempo de 600 g por 11 minutos y

750 g por 8 minutos, respectivamente. Según estos valores existe una ligera mejora en el vigor de los espermatozoides diluidos en el diluyente de congelación BotuCrio®. No obstante, los tratamientos utilizados no influyen significativamente sobre el vigor. En relación con este parámetro Pérez (2017) reporta un vigor de tres en el semen fresco, para el caso de la raza criollo colombiano. En la raza Mangalarga Marchador, (Pugliese *et al.*, 2012) encontraron un vigor de 3.4 ± 0.4 en semen diluido en el diluyente Kenney en ambos estudios los valores son similares a los encontrados en este trabajo.

Los resultados de vigor espermático para semen descongelado fueron de 2.83 ± 0.4 y 2.83 ± 0.4 para las combinaciones de fuerza centrífuga y tiempo de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos, respectivamente. Como se puede observar las medias son completamente iguales para ambos tratamientos de centrifugación. Resultados similares encontró Nascimento *et al.*, (2015), en su estudio reportan un vigor espermático de 2.7 ± 0.66 utilizando una combinación de fuerza y tiempo de 650 g por 10 minutos, empleando además el mismo diluyente, pero en la raza Mangalarga Marchador.

Mascarenhas *et al.*, (2014) utilizando una combinación de fuerza y tiempo de 650 g por 10 minutos, encontró un vigor de $2,48 \pm 0,73$, en tal estudio se empleó la misma raza y diluyente que en nuestro trabajo.

En relación con este parámetro Alvarenga *et al.*, (2014) y Braga (2013) señalan que el vigor aceptable para el semen descongelado equino debe ser mayor o igual a tres en escala de 1-5. Un estudio de Ospitia y González (2011) ha logrado alcanzar este valor al criopreservar semen de la raza Criollo Colombiano, utilizando un diluyente modificado (INRA82®+Dimetilformamida (DMF)).

Paredes (2015), también reporta un vigor superior a 3 en el semen posdescongelación utilizando el diluyente INRA82® suplementado con 2% de yema de huevo y 5% de DMF. Mascarenhas *et al.*, (2014) argumenta que utilizar este crioprotector en los diluyentes de congelación mejora significativamente los parámetros seminales en comparación cuando solo se utiliza glicerol.

6.3 Resultados y discusión de sobrevivencia espermática

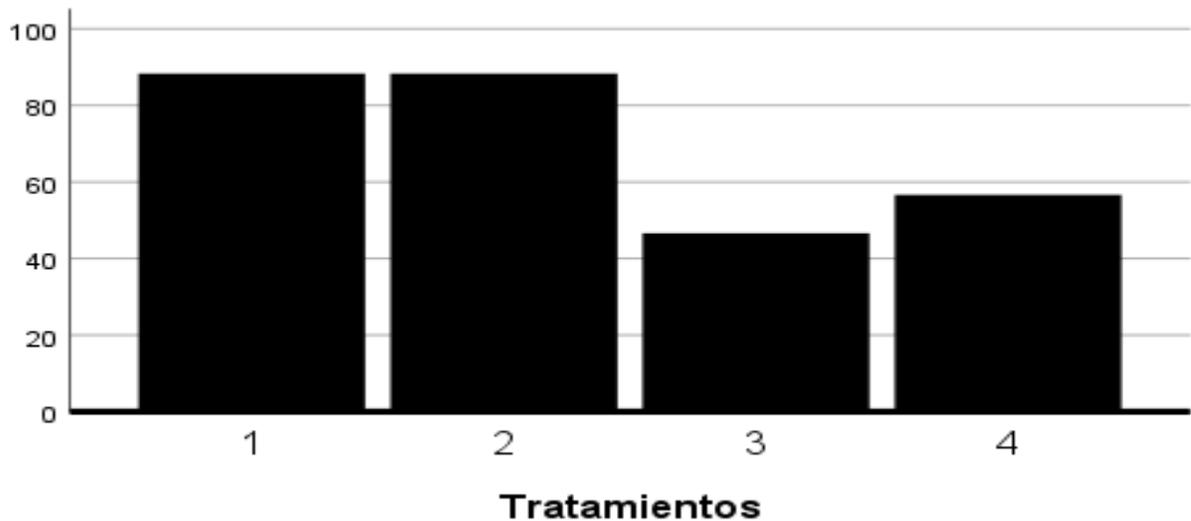
Los resultados del porcentaje de sobrevivencia de espermatozoides no difirieron entre los T1 y T2, por otra parte, el T3 difirió significativamente del T4 ($P < 0.01$) de la misma manera los T1 y T2 difirieron significativamente ($P < 0.01$) de los T3 y T4. Estos resultados revelan que la reducción en el porcentaje de sobrevivencia de espermatozoides luego de la descongelación, en ambos métodos de centrifugación es altamente significativo, nos obstante el T4, muestra una tasa de sobrevivencia significativamente superior a la del T3, Ver tabla cinco.

Tabla 5: Tasa de sobrevivencia promedio en los tratamientos evaluados.

Tratamientos	Espermatozoides vivos en (%) (Media y Desviación Estándart)
1	88.33±4.08 ^a
2	88.33±4.08 ^a
3	46.67±8.16 ^b
4	56.67±8.16 ^c

Diferentes letras subíndices indican diferencias significativas ($P < 0.001$).

Figura 4: Porcentaje promedio de supervivencia espermática en cada tratamiento.



La tasa de supervivencia de los espermatozoides post-centrifugación fue de 88.33 ± 4.08 para ambas combinaciones de fuerza centrífuga y tiempo. Es notable un aumento del porcentaje de espermatozoides vivos con respecto al semen fresco ya que durante la centrifugación muchos espermatozoides muertos quedan en el sobrenadante. Esta pérdida es aproximadamente del 25 % (Loomis, 2006 y Bradecamp, 2014a).

Las tasas de supervivencia posdescongelación fue de 46.67 ± 8.16 y 56.67 ± 8.16 para la combinación de fuerzas centrífugas y tiempo de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente. Esta última revela una mayor tasa de supervivencia estadísticamente significativa. Un estudio de León y Moreno (2006) utilizando una fuerza de centrifugación similar en la criopreservación de semen de la raza criollo colombiano reporta valores menores que oscilan entre los 30 y 31 % de supervivencia. Mientras que Pineda y Pinilla (2007) lograron resultados mayores de supervivencia

(64%) utilizando un diluyente modificado (INRA 82® + DMF) en diferentes razas de caballos.

En un estudio de Clavijo (2015) utilizando el mismo diluyente de congelación que en nuestro trabajo (Botucrio®) en la criopreservación de semen de la raza Española, encontró una tasa de sobrevivencia menores que las nuestras 39.5 %. No obstante, en su trabajo dicho parámetro fue muy superior al semen criopreservado utilizando otro diluyente (Equipro®) 15.88%.

La sobrevivencia espermática depende de muchos factores, entre ellos los importantes son los cambios de temperatura y alteraciones de la membrana del espermatozoide, no obstante, los espermatozoides equinos luego de la posdescongelación en promedio pueden sobrevivir el 50 % de ellos (Clavijo, 2015).

En este trabajo se ha encontrado una sobrevivencia mayor en el semen descongelado que fue centrifugado a 750 g por 8 minutos, posiblemente por un menor daño a las membrana plasmática y acrosómica de los espermatozoides que ocasionaría la fuerza de 600 g por 11 minutos. Al respecto Restrepo *et al.*, (2014), menciona que los daños que ocasiona la centrifugación sobre las membranas de los espermatozoides no solo dependen de la fuerza sino también del tiempo en que se ejecuta.

VII CONCLUSIONES

El semen poscentrifugación y posdescongelación no presenta variaciones en cuanto a la motilidad progresiva, cuando se aplica una fuerza centrífuga de 600 *g* por 11 minutos o una fuerza centrífuga de 750 *g* por 8 minutos.

El semen poscentrifugación y posdescongelación no presenta diferencias en cuanto al vigor espermático, cuando se aplica una fuerza centrífuga de 600 *g* por 11 minutos o una fuerza centrífuga de 750 *g* por 8 minutos.

El semen poscentrifugación no presenta variaciones en cuanto a la sobrevivencia espermática independientemente de la combinación de fuerza y tiempo empleada, en cambio en el semen posdescongelación, al utilizar una fuerza centrífuga de 750 *g* por 8 minutos, se obtiene un mayor porcentaje de sobrevivencia espermática que cuando se emplea una fuerza centrífuga de 600 *g* por 11 minutos.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga M, A; Papa F, O; Neto C, R. (2017). Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 41 (1): 81-85.
- Alvarenga M.A; Papa F.O; Carmo M.T; Kievitsbosch T; Manoela M; Chaves C; Neto C.R. (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 424-429.
- Alvarenga M.A; Papa F.O; Neto C.R. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinic Equine* 32: 521–530.
- Amann R, P. (1981). A review of anatomy and physiology of the stallion. *Equine Veterinary Science*, 83-105.
- Aürich J; Kuhl J; Tichy A; Aürich C. (2020). Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals* 10: 1-13.
- Baky A, A; Hashima A; Ashraf E; Hamdy M; Helmy A. (2020). Functional anatomy of male genital system in Stallion. Student review article. Faculty of Veterinary Medicine | Beni-suef University.
- Ball, B.A. (2008). Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science* 28(11): 650-664.
- Borg K; Colenbrander B; Fazeli A; Parlevliet J; Malmgren L. (1997). Influence of thawing method on mcyfility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 46: 531-536.
- Bradecamp E.A. (2014a). Centrifugation of Semen: Cushion Technique. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures*. Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

- Bradecamp, E.A. (2014b). Centrifugation of Semen: Standard Technique. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures*. Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Braga, N. (2013). Criopreservação de Sêmen Equino. Monografia apresentada como exigência final para obtenção do título de Médico Veterinário do curso de Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília/DF, Brasil.
- Brinsko S, P; Varner D, D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8 1: 205-218.
- Brinsko. (2011). Semen preservation. En: *manual of equine reproduction (3rd ed.)*. Brinsko S, P; Blanchard T, L; Varner D, D; Schumacher J; Love C, C; Hinrichs K; Hartman D. T. Maryland Heights, Missouri, Estados unidos. Mosby Elsevier.
- Brinsko S, P; Crockett, E, C; Squires E, L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54: 129-136.
- Brito, L. (2007). Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques Equine Practice* 6:249-264.
- Camacho C, A. (2014). Evaluación de los diluyentes INRA 82 y Botucrío para la criopreservación espermática de caballos criollos colombianos. Trabajo de grado como requisito para optar el título de Magister en Ciencias Veterinarias. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
- Cecere, J.T. (2014). Eosin-Nigrosin Staining in the Evaluation of Sperm. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures*. Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

- Clavijo, L., Caiza, F. (2015). Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.
- Cochran J, D; Amann R, P; Froman; Pickett B, W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5% freezing rate and thawing rate on the motility equine. *Theriogenology* 22 (1): 25-38.
- Colenbrander, B; Gadell, B.M; Stout, T.A.E. (2003). The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction Domestic Animal* 38: 305–311.
- Dascanio, J.J. (2014). Computer-Assisted Sperm Analysis. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures*. Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Dell'aqua J, A, Papa F, O, Alvarenga M, A. (2001). Effect of centrifugation an packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science* 68: 324–325.
- Ecot, P; Decuadro-Hansen G; Delhomme G; Vidament M. (2005). Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. 4. International Symposium on Stallion Reproduction, Hanovre, Germany. hal-02763505.
- Ferreira H, N. (2008). Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen eqüino. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Universidade Estadual

Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu.
São Paulo, Brasil.

Gary W; Dean, D. (2009). Effect of Centrifugation Technique on Post-storage Characteristics of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 29: 675-680.

Gutiérrez, L.C. (2014). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Tesis doctoral presentada para la obtención del Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Gutiérrez, L.C; Fernández, A.F; Crespo, J; Gosálvez, C; Serres. (2011). Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science* 124: 85–89.

Gutiérrez, L.C; Fernández, A; Crespo, F; Ramírez, M.A; Gosálvez, J; Serres, C. (2012). The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54 (72): 1-8.

Hayden S, S; Blanchard T, L; Brinsko S, P; Varner D, D; Hinrichs K; Love C, C. (2015). The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology* 83: 772–777.

Henneke, D. R., Potter G.D., Kreider, J.L., & Yeates, B.F. (1983). Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371-372.

- Hoogewijs, M; Rijsselaere, T; De Vlieghe, S; Vanhaesebrouck, E; De Schauwer C, Govaere, J; Thys, M; Hoflack, G; Van Soom, A; De Kruif, A. (2010). Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74: 118–126.
- Hurtgen J, P. (2009). Semen Collection in Stallions. *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp. 33-39). St.Louis, Missouri, Estado Unidos: Saunders Elsevier.
- Jasko, D.J. (1992). Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8: 129–148.
- Katila, T. (2001). In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42(2): 199-217.
- León, S, A; Moreno D, A. (2006). Efecto de la asociación l-glutamina - etilenglicol en la criopreservación de semen equino. Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de médico veterinario. Universidad De La Salle. Bogotá, Colombia.
- Little T, V; Holyoak. (1992). Reproductive anatomy and physiology of the stallion. *Veterinary clinics of North America: Equine Practice* 8 (1): 1-29.
- Loomis P.R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinic Equine* 22: 663–676.
- Love, C.C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility. *Theriogenology* 76: 547–557.
- Love, C.C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinic Equine* 32: 531–546.

- Mari, G; Bucci,D; Love, C; Mislei, B; Rizzato, G; Giaretta, E; Merlo, B. Spinaci, M. (2014). Effect of Cushioned or Single Layer Semen Centrifugation Prior to Sex Sorting on Frozen Stallion Semen Quality. *Theriogenology* 83: 953-958.
- Mascarenhas, D., Martiliano, D., Linhares, S., Ferreira., S, Castelo, M., Torres, J. (2014). Eficiencia dos diluidores tris e botu sobre os parámetros seminais de garanhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador. *Ciencia animal brasileira* 15 (3), 322-329.
- McCue, P.M. (2014). Breeding Soundness Evaluation of the Stallion. En J Dascanio and P.M. McCue. *Equine Reproductive Procedures*. Colorado, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Méndez, C. (2015). Efecto de un gradiente de centrifugación sobre la calidad del semen equino. Requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencia Animal. Universidad autónoma de nuevo león. Nuevo León, México.
- Meyers S, A. (2009). Sperm Physiology. *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp. 47-55). St.Louis, Missouri, Estado Unidos: Saunders Elsevier.
- Mocé, E; Graham, J.K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105: 104–118.
- Morrell J, M; Rodriguez H, M. (2016). Colloid Centrifugation of Semen: Applications in Assisted Reproduction. *American Journal of Analytical Chemistry* 7: 597-610.
- Morrell J.M; Kumaresan A; Johannisson A. (2017). Practical implications of sperm selection techniques for improving reproduction. *Animal Reproduction* 14 (3): 572-580.

- Morrell J.M; Rodriguez, H.M; Johannisson, A. (2010). Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reproductive BioMedicine Online* 21: 429- 436.
- of stallions. *Theriogenology* 76: 547–557.
- Nascimentos, J, N; Blume, H; Oliveira, F, J; Oliveira R, A. (Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões mangalarga marchador. *Ciencia Animal Brasileira* 16 (3): 324-330.
- Ortega Ferrusola, C. (2011). Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos. Tesis doctoral presentada para la obtención del Grado de Doctor. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.
- Ospitia, P; González, A. (2011). Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática equina en caballos de la sabana de Bogotá. Tesis presentada para obtener el título de médico veterinario. Universidad De La Salle. Bogotá, Colombia.
- Papa F, O; Alvarenga M, A; Dell'aqua JR J, A; Monteiro G, A. Sancler-silva, Y; Neto C, R. (2014). Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino. Bothupharma.
- Paredes, A. (2015). Determinación de la viabilidad espermática post-descongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano. Trabajo para optar al título de Médico Veterinario. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
- Pérez, D, D. (2014). Evaluar el efecto crioprotector de la dimetilformamida en diferentes tiempos de adición en la criopreservación de semen en caballos

- criollos colombianos. Trabajo de grado como requisito para optar el título de: Magister en Ciencias Veterinarias. Universidad De La Salle, Bogotá, Colombia.
- Pineda, S., Pinilla, M. (2007). Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en la preservación de semen equino. Trabajo para optar al título de Médico Veterinario. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.
- Pugliesi, G; Ribeiro, G; Macêdo D; Gama, P; Pereira, M; Oliveira, R; Monteiro, J. (2012). Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41(12): 2411-2417.
- Restrepo, G. B; Cantero, J.N; Montoya, J.P. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. *Bioteχνología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14 (1): 119 – 125.
- Restrepo, G.B; Úsuga, A.S; Rojano, B.A. (2013). Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8(1): 115-127.
- Ribeiro B, A; Dos Santos R, R; Marques G, A; Gorzoni E, F; Aparecida L, T; Dell'Aqua Jr J, A; Marini C, M d; Soares F, Z; Martin I; Marco Antonio Alvarenga M, A; Papa F, O. (2015). Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions. *Theriogenology* 83 (9): 1389-1393.
- Riccio G, N; Ellerbrock R, E; Canisso I, F; Knox; R, V; Kline K, H. (2016). Motility of Stallion Spermatozoa after Centrifugation and Cooling in INRA96® or Walworth Extender. *Journal of Agricultural Science and Technology* 6: 143-147.

Sieme, H. (2009). Semen Evaluation. En J.C. Samper. (Ed), *Equine breeding management and artificial insemination*. (pp. 57-74). St.Louis, Missouri, Estado Unidos: Saunders Elsevier.

Sielhorst, J; Hagen, C; Behrendt, D; Schuette, B; Dominik Burger, Martinsson, G; Sieme, H. (2016). Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 40: 56-61.

Varner, D.D. (2008). Developments in stallion semen Evaluation. *Theriogenology* 70: 448–462.