



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

"EFECTO DEL ENFRIADO PRECONGELACIÓN A -3°C SOBRE LA CRIOSUPERVIVENCIA Y LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DE ESPERMATOZOIDES DE EQUINO"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

LUIS ARMANDO CONTRERAS MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ, FES CUAUTILÁN-UNAM.

COMITÉ TUTORAL:

**DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO, FMVZ-UNAM.
DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ, FMVZ-UNAM.**

MÉXICO, D.F.

MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto se realizó en el laboratorio 2 (Reproducción y Comportamiento Animal) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, bajo la tutela del Dr. José Alfredo Medrano Hernández, con el financiamiento del Proyecto PAPIIT número IT201713 “Evaluación Estructural y Funcional de Espermatozoides de Equino Enfriados a 5°C Bajo Cero Previo a la Congelación”.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Alfredo Medrano Hernández, por su apoyo y confianza para la realización de este proyecto.

A los miembros del Comité Tutoral el Dr. Luis Alberto Zarco Quintero y el Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez, por seguir mi trabajo desde que estaba en planeación, por sus grandes aportaciones al mismo y por el tiempo que me dedicaron durante todo este proceso.

A los miembros de mi jurado: Dr. Martín Martínez Torres, Dr. Salvador Romo García, Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y Dra. Ana Myriam Boeta Acosta; por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y su orientación para enriquecerlo.

Al M en C. Francisco Rodolfo González Díaz, por su orientación en todos los procesos, por su gran paciencia y disposición durante las largas jornadas de trabajo.

A la M en C. Rosalba Soto González, por confiar en mí y apoyarme incondicionalmente hasta el final.

Al MVZ. Miguel Ángel Vila Velázquez, porque sin conocerme me ayudo como nadie, facilitándome a los sementales, prestándome sus instalaciones y ayudándome durante todas las jornadas de trabajo en campo. Todo sin ningún tipo de interés, únicamente con el fin de aportar una invaluable ayuda para un estudiante amante de los caballos. A Usted ¡MIL GRACIAS!.

Al M en C. Alan Olazábal Fenchio, ya que siempre me impulso a no desistir y poder lograr el objetivo de titularme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo otorgado para la realización y culminación de este proyecto.

Al proyecto PAPIIT número IT201713, por otorgar el financiamiento para esta investigación.

DEDICATORIAS

A mi madre Patricia y a mi abuelita Gladis, porque gracias a ellas he logrado ser lo que soy, siempre contando con su apoyo, su guía y su impulso para ser un hombre de bien y un digno profesionista, para Ustedes este logro, porque siempre hemos sido un equipo.

Al MVZ. Julio Antonio Ojeda Franco, por ser como un padre para mí, por haber sido el que me mostró este mundo tan fascinante que es la Medicina Veterinaria y porque siempre he tenido su apoyo incondicional para todo lo que emprendo, tanto personal como profesionalmente; Hombro con hombro hasta el final!!!!

A todas las personas que me acompañaron a lo largo de este difícil proceso y que directa o indirectamente contribuyeron para que este proyecto culminara favorablemente. A todos ustedes... GRACIAS.

ÍNDICE

	Páginas
Índice.....	i
Índice de Cuadros.....	iv
Índice de Gráficas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Revisión de Literatura.....	3
2.1. Desarrollo Histórico de la Criopreservación.....	3
2.2. Evolución de la Congelación Seminal en la Especie Equina.....	4
2.3. Evaluación seminal.....	6
2.3.1. Volumen Seminal.....	6
2.3.2. Color del eyaculado.....	6
2.3.3. Motilidad Espermática.....	7
2.3.3.1. Métodos de Evaluación de la Motilidad Espermática.....	7
2.3.3.2. Evaluación Visual.....	7
2.3.3.3. Evaluación Mediante Análisis Espermático Asistido por Computadora (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis).....	7
2.3.4. Concentración Espermática.....	8
2.3.4.1. Métodos de Evaluación de la Motilidad Espermática.....	8
2.3.4.2. Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.....	8
2.3.4.2. Análisis Espermático Asistido por Computadora (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis).....	9
2.3.4.3. Contadores Celulares Electrónicos.....	9
2.3.4.4. Espectrofotómetro Calibrado.....	9
2.3.5. Morfología Espermática.....	10
2.3.5.1. Métodos de Evaluación de Morfología Espermática.....	10
2.3.5.2. Tinciones.....	10
2.3.6. Evaluación de Membrana Plasmática.....	11

2.3.6.1. Prueba de Hinchamiento Hiposmótico (HOST, Hypo-Osmotic Swelling Test).....	11
2.3.6.2. Tinciones Fluorescentes.....	11
2.3.6.3. Tinciones Supravitales.....	12
2.4. Enfriado y Congelación Seminal.....	12
2.4.1. Agentes Crioprotectores.....	12
2.4.1.1. Crioprotectores Permeables.....	13
2.4.1.1.2. Glicerol.....	14
2.4.1.2. Crioprotectores Permeables Alternativos.....	15
2.4.1.3. Crioprotectores no Permeables.....	15
2.4.1.3.1. Yema de Huevo.....	15
2.4.1.3.2. Leche Descremada.....	15
2.4.1.3.3. Azúcares.....	16
2.4.2. Diluyentes de Congelación.....	16
2.5. Equilibrado, Refrigeración, Congelación y Almacenamiento.....	17
2.6. Daños Producidos en el Espermatozoide Durante la Congelación.....	19
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	26
6. Materiales y Métodos.....	27
6.1. Diseño Experimental.....	27
6.2. Obtención del Semen.....	29
6.3. Evaluación microscópica seminal.....	30
6.3.1. Motilidad Individual Progresiva.....	30
6.3.2. Concentración Espermática.....	31
6.3.3. Viabilidad (Integridad de la Membrana Plasmática).....	31
6.3.4. Anormalidades Espermáticas.....	32
6.3.5. Estado de Capacitación.....	32
6.3.6. Integridad Acrosomal.....	34
6.4. Dilución Seminal.....	34
6.4.1. Diluyente Criopreservador.....	35

6.5. Envasado.....	36
6.6. Enfriado Precongelación.....	36
6.7. Congelación.....	38
6.8. Descongelación.....	38
6.9. Análisis Estadístico.....	40
7. Resultados.....	40
8. Discusión.....	51
9. Conclusión.....	53
10. Bibliografía.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Páginas

Cuadro 1. Características de los espermatozoides diluidos de equino en un diluyente comercial (INRA96®), transportados a 30°C en un termo y atemperados a 23°C en el laboratorio.....	42
Cuadro 2. Características de los espermatozoides diluidos de equino en un diluyente comercial (INRA96®) adicionado con 2.5% de glicerol, previo al enfriado lento de 23 a 5°C.....	43
Cuadro 3. Efecto del enfriado lento a dos temperaturas blanco sobre las características de espermatozoides de equino al descongelado.....	44
Cuadro 4. Efecto del enfriado a dos temperaturas blanco sobre la calidad de los espermatozoides de equino incubados en TALP sin (-) o con (+) progesterona (P4) posterior a la criopreservación.....	45
Cuadro 5. Efecto del enfriado a dos temperaturas blanco sobre el estado de capacitación de los espermatozoides de equino incubados en TALP sin (-) o con (+) progesterona (P4) posterior a la criopreservación.....	46

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Páginas

Curva de Enfriado de +5°C a -3°C.....	37
Gráfica 1. Espermatozoides Vivos, Prueba SYBR14/PI.....	47
Gráfica 2. Espermatozoides Vivos, Prueba Eosina-Nigrosina.....	47
Gráfica 3. Espermatozoides Vivos, Prueba HOST.....	48
Gráfica 4. Motilidad Progresiva.....	48
Gráfica 5. Acrosoma Intacto, Lectinas PSA-FITC.....	49
Gráfica 6. Prueba CTC, Patrón F (no capacitados).....	49
Gráfica 7. Prueba CTC, Patrón B (capacitados).....	50
Gráfica 8. Prueba CTC, Patrón AR (reacción acrosomal).....	50

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar si el enfriamiento lento a -3°C (en lugar de 5°C), previo a la congelación, podría mejorar la supervivencia espermática de equino y su capacidad para llevar a cabo la capacitación y la reacción acrosomal después de la congelación. El semen se recolectó de 5 sementales (al menos 5 eyaculados de cada uno) mediante el uso de vagina artificial, se diluyó (1:1) y fue transportado al laboratorio, al arribo se centrifugó y rediluyó en un diluyente comercial (INRA96) enriquecido con glicerol (concentración final 2,5%) y yema de huevo clarificada (concentración final 2%), el semen fue envasado en pajillas de 0,5 ml de plástico y se enfrió lentamente de 23 a 5°C durante 2 horas ($0,15^{\circ}\text{C} / \text{min}$ aprox.). Las pajillas se mantuvieron a 5°C durante aproximadamente 18 horas, posteriormente la mitad de las pajillas (Control) se congelaron sobre vapores de nitrógeno durante 12 min y se sumergieron en nitrógeno líquido; la otra mitad (Experimental) se enfrió adicionalmente hasta los -3°C ($0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ aprox.) y se congeló del mismo modo que las pajillas control. Algunas pajillas de cada tratamiento se descongelaron en un baño de maría a 37°C durante 30 segundos; motilidad espermática, integridad de la membrana plasmática (SYBR14/PI, Eosina-Nigrosina, HOST), integridad acrosomal (PSA-FITC) y el estado de capacitación (Ensayo de CTC) fueron evaluados antes y después del proceso de congelación-descongelación. Otras pajillas de cada tratamiento se descongelaron como se ha mencionado y el semen fue vertido en tubos, se centrifugó para eliminar el medio de congelación (INRA96) y se le añadió medio TALP (160×10^6 células / ml). Los espermatozoides en TALP se incubaron 4 horas a 37°C en 5% de CO_2 , posteriormente, a una parte de la alícuota se le añadió progesterona (P4 $2\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó adicionalmente durante 30 min, así como el resto de los espermatozoides; la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma y el estado de capacitación fueron evaluados. A la descongelación, no hubo diferencias entre los tratamientos con frío (5°C vs -3°C) en la motilidad individual progresiva, integridad de la membrana plasmática evaluado por Eosina-Nigrosina o HOST, la integridad del acrosoma y el estado de la capacitación; Sin embargo, hubo una diferencia ($P < 0,05$) con respecto a la integridad de la membrana plasmática evaluado por la tinción fluorescente SYBR14/PI. En cuanto a la incubación con o sin P4, la motilidad no fue diferente entre los tratamientos (19 y 16%) pero las células con membrana plasmática intacta de fueron diferentes ($P < 0,05$): 21 vs 18%, C y E, respectivamente. Espermatozoides con acrosoma intacto disminuyeron a medida que progresó la incubación, pero no hubo diferencias entre los tratamientos, independientemente de P4: 58 y 58%, C y E, respectivamente. Espermatozoides capacitados (B) y con reacción acrosomal (AR) aumentaron a medida que progresó la incubación, pero no hubo diferencias entre los tratamientos independientemente de P4: 57 y 59% (modelo B) C y E, respectivamente. En conclusión, el enfriamiento lento pre congelación a -3°C , mejora la supervivencia espermática en relación con las células de membrana plasmática intacta; los espermatozoides de equino incubados con TALP se capacitaban y sufrieron reacción acrosomal pero estos procesos no se vieron afectados por la adición de P4 o las temperaturas de enfriamiento pre congelación.

ABSTRACT

The objective of this work was to see whether slow cooling to -3°C (instead of $+5^{\circ}\text{C}$), before freezing, could improve horse sperm cryosurvival and their capability to carry out capacitation and the acrosome reaction after freezing. Semen was collected from 5 stallions (5 ejaculates from each) by artificial vagina, diluted and transported to the lab, centrifuged and rediluted in a commercial extender (INRA96) added with glycerol (2.5% final concentration), packaged in 0.5 ml plastic straws and slowly cooled from 23 to 5°C over 2 hours ($0.15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ approx.). Straws were kept at 5°C for about 18 hours. Then, one half of the straws (C) was frozen over nitrogen vapors for 12 min, immediately after they were immersed in liquid nitrogen; the other half (E) was further cooled to -3°C ($0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ approx.) and frozen as mentioned. Some straws from each treatment were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds; motile spermatozoa, plasma membrane integrity (SYBR14/PI, Eosin-Nigrosin, HOST), acrosome integrity (PSA-FITC), and capacitation status (CTC assay) were assessed before and after freeze-thawing. Other straws from each treatment were thawed as mentioned and sperm were poured in tubes and centrifuged to remove INRA96 and to add TALP medium (160×10^6 cells/ml). Sperm in TALP were incubated 4 hrs at 37°C in 5% CO_2 . Then an aliquot was added progesterone (P4 $2\mu\text{g}/\text{ml}$) and was further incubated for 30 min as well as the rest of the sperm; motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity and capacitation status were assessed. After thawing, there were no differences between cooling treatments ($+5^{\circ}\text{C}$ vs -3°C) on motile cells, plasma membrane integrity assessed by either Eosin-Nigrosine or HOST, acrosome integrity and capacitation status; however, there was a difference ($P < 0.05$) regarding plasma membrane integrity assessed by the fluorescent stain SYBR14/PI. Regarding the incubation with or without P4, motility was not different between treatments (19 and 16%) but plasma membrane-intact cells were different ($P < 0.05$): 21 vs. 18%, C and E respectively. Acrosome-intact cells decreased as incubation progressed but there were no differences between treatments regardless of P4: 58 and 58%, C and E respectively. Both capacitated (B) and acrosome-reacted (AR) sperm increased as incubation progressed but there were no differences between treatments regardless of P4: 57 and 59% (pattern B) C and E respectively. In conclusion, slow cooling to -3°C , before freezing, improved sperm cryosurvival regarding plasma membrane-intact cells; horse sperm incubated with TALP became capacitated and suffered the acrosome reaction but these processes were not affected by the addition of P4 or the pre-freeze cooling temperatures.

1. INTRODUCCIÓN.

La recolección y conservación de gametos y embriones mediante el uso de modernas tecnologías reproductivas, permite un uso más racional del material genético de una especie, facilitando la multiplicación del número de ejemplares de alto valor genético y disminuyendo los niveles de consanguinidad (Loomis, 2006).

El gran desarrollo de la inseminación artificial ha incrementado el interés de investigadores y clínicos por las técnicas de procesamiento de semen, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas que minimicen el daño espermático a la vez que maximicen su viabilidad, supervivencia y fertilidad (Loomis, 2006).

El primer artículo sobre congelación de semen equino fue publicado en 1950 por Smith y Polge, quienes lograron una supervivencia del 25% de los espermatozoides que congelaron a -79°C en una solución con glucosa y glicerol y unos años más tarde se describió el nacimiento del primer potro con semen congelado (Barker y Gandier, 1957).

A partir de ese momento se ha investigado mucho en esta área y actualmente el uso de semen criopreservado de equino es cada vez más frecuentemente utilizado por las ventajas que implica, aunque aún existe gran variabilidad en cuanto a su calidad en el mercado y los resultados obtenidos, debido a una falta completa de estandarización en la metodología de procesamiento seminal e inseminación así como en los criterios y métodos estándares de evaluación de la calidad seminal pre y postdescongelado (Samper y Morris, 1998; Metcalf, 2007; Sieme *et al.*, 2008).

Uno de los factores más importantes implicados que limitan el desarrollo a gran escala de esta tecnología y su estandarización, es la variabilidad individual existente entre los sementales (Samper y Morris, 1998; Loomis, 2001; Sieme *et al.*, 2008, Loomis y Graham, 2008; Morell *et al.*, 2011). Esto se debe en gran medida al tipo de selección al que han sido sometidos, basada principalmente en

términos de genealogía, rendimiento atlético o morfología, más que de eficiencia reproductiva (Varner et al., 2008).

En 1987, Aniann y Pickett postularon que era poco realista asumir que todos los eyaculados de todos los sementales debían ser congelados con el mismo protocolo, debido a la gran variación que existe entre razas y entre sementales, debido a eso, propusieron que se deben optimizar e identificar los diluyentes y tasas de congelación - descongelación, buscando el protocolo con mejores resultados para cada individuo. Hoy en día muchos laboratorios comerciales de congelación de semen equino han adaptado un mecanismo denominado "Prueba de Congelación" para evaluar cada nuevo semental a la hora de incluirlo en un proceso de criopreservación seminal (Loomis y Graham, 2008).

A través de este procedimiento, uno o varios eyaculados son divididos y procesados utilizando varios protocolos (incluyendo varios diluyentes de congelación) con el objetivo de determinar con cuál de ellos el semental puede producir muestras postdescongelado de calidad aceptable, maximizando así los resultados obtenidos individualmente; y así incrementar el número de sementales que pueden ser utilizados con éxito en procesos de criopreservación seminal se ha convertido en uno de los objetivos de la industria reproductiva equina (Loomis y Graham, 2008).

A nivel internacional se considera un semental "apto para proceso de congelación seminal" si presenta valores de motilidad progresiva >50-60% en semen fresco y >30-35% en semen postdescongelado (Vidament *et al.*, 1997; Samper y Morris, 1998; Loomis y Graham, 2008).

Es preferente que la "Prueba de Congelación" sea ejecutada en varios eyaculados previo a elegir aquel semental que optimiza los resultados obtenidos, lo que conlleva inversión de mucho tiempo y desembolso excesivo de dinero para el propietario y un alto costo para el laboratorio de criopreservación. Sin embargo, es

evidente el efecto benéfico que este procedimiento tiene sobre el número de espermatozoides que son aceptados como aptos para la criopreservación seminal y son varios autores los que han relatado su eficacia en este sentido (Loomis, 2001; Vidament, 2005; Loomis y Graham, 2008).

También se han establecido diferencias en cuanto a la calidad seminal entre razas (Alvarenga et al., 2003), siendo el caballo de Pura Raza Española un modelo de raza de mala calidad seminal. Debido a ello, existe un número limitado de ejemplares Pura Raza Española que superen el 50% de motilidad progresiva necesario para que el procesado de congelación-descongelación dé resultados satisfactorios (Loomis y Graham, 2008).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESARROLLO HISTÓRICO DE LA CRIOPRESERVACION.

Se tiene conocimiento que los primeros estudios realizados sobre los efectos producidos por temperaturas de congelación sobre la criosupervivencia espermática se remontan aproximadamente al año 1776, cuando el investigador Lazzaro Spallanzani introdujo viales que contenían semen de mamífero en nieve, después los retornó a la temperatura ambiente y pudo observar espermatozoides con motilidad (Salamon, *et al.*, 1995).

Inicialmente, los científicos se limitaron a probar con bajas temperaturas que se lograban en la naturaleza. Igualmente varios investigadores en la segunda mitad del siglo XIX, experimentaron poniendo espermatozoides a temperaturas por debajo de los 0°C pero nunca superando los -30°C, Mantegazza (1866) y Davenport (1897) observaron como sobrevivían espermatozoides humanos congelados a -17°C, igualmente Pavlov y sus colaboradores en 1924 congelaron espermatozoides de cucarachas y de mamíferos, ayudándose con una mezcla de nieve y alcohol, lo cual les permitió llegar a los -23°C, y pudieron percatarse que

posterior a la descongelación algunas células podían recuperar su motilidad. También en ese año Gellhorn logró fecundar ovocitos de rana con semen previamente congelado a -13°C y alcanzó una tasa de fecundación del 93% (Salamon, *et al.*, 1995).

Los primeros trabajos que buscaban proteger las células espermáticas durante los procesos de congelación y descongelación, describían medios compuestos por altas concentraciones de azúcares; en 1938 Luyet y Hodapp descongelaron espermatozoides de rana los cuales habían sido vitrificados en una solución concentrada de sacarosa (40%) e inmersos en aire líquido (-192°C), 3 años después en 1941, Schafner publicó sus experimentos, en los cuales lograba un porcentaje de supervivencia del 30%, en espermatozoides de ave utilizando una solución 0,75 M de fructosa y sometiendo a una congelación rápida hasta los -79°C . También en la década de los cuarenta, Hoagland y Pincus probaron varios métodos para la vitrificación de semen de diferentes especies de mamíferos, incluida la humana, obteniendo pobres resultados en todos los casos, mientras que un resultado distinto fue obtenido por Parker en 1945, quien observó espermatozoides móviles tras la congelación de semen humano (Salamon, *et al.*, 1995).

Los primeros registros de la utilización del glicerol como agente crioprotector se remontan al año de 1908, cuando Maximov suspendió tejidos y células vegetales en una solución de glicerol, pudiendo observar sobrevivían parcialmente a la congelación a -22°C (Salamon, *et al.*, 1995).

En la actualidad, los protocolos de criopreservación se encuentran ampliamente extendidos en el campo de la producción animal para el mantenimiento a largo plazo de espermatozoides, ovocitos y embriones (Mazur, *et al.*, 2008).

2.2. EVOLUCIÓN DE LA CONGELACIÓN SEMINAL EN LA ESPECIE EQUINA.

Se tiene evidencia que el primer experimento de criopreservación de semen equino, se llevó a cabo en el año de 1907, cuando Ivanov pudo observar

espermatozoides móviles tras congelarlos a -15°C , pero cuando llevó la congelación a los -100°C no observó espermatozoides móviles. Por otro lado en el año de 1938 Jahnel demostró que tras congelar semen de humano a diferentes temperaturas bajo 0 como la del hielo seco (-79°C) o la del nitrógeno líquido (-196°C), en el momento de la descongelación se identificaban espermatozoides motiles (Salamon, *et al.*, 1995).

En la actualidad se ha dado lugar a un interés creciente por la congelación seminal en la especie equina, lo que ha puesto de manifiesto la necesidad de conocer la fisiología del espermatozoide equino, cómo se comporta esta célula durante los procesos de congelación-descongelación y cuáles son los principales daños que sufre durante el proceso. Todo esto para poder crear y desarrollar nuevos protocolos de congelación propios de la especie, ya que hasta el momento esta tecnología se ha desarrollado de forma empírica en el caballo, adaptando la tecnología desarrollada en otras especies (Sieme, *et al.*, 2008).

Estudios recientes demuestran que sólo el 20-30% de los sementales producen un semen con buena capacidad de congelación, "buenos congeladores", otro 40-60% tienen características seminales consideradas como aceptables (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación) y otro 20-30% de sementales producen semen que no es congelable en absoluto, "malos congeladores". Por este motivo, hay sementales que presentan una buena fertilidad con semen fresco y refrigerado, mientras que por el contrario con semen congelado presentan una baja fertilidad. Los factores relacionados con esta diferencia en la respuesta a la congelación entre sementales, no están totalmente esclarecidos; siendo el origen genético el más aceptado, ya que el esquema de selección impuesto en el caballo se basa en caracteres morfológicos y funcionales, sin prestar atención a caracteres como la congelabilidad de sus eyaculados, parámetro que cobra un gran interés en el caso de otras especies como el bovino. (Tischner, 1979; Brinsko, 2000; Loomis y Graham, 2008; Vidament, 2005).

Independientemente de las desventajas que tiene la utilización del semen congelado, su uso ofrece una serie de beneficios en comparación al semen fresco

o refrigerado; ya que la criopreservación seminal, permite a los propietarios de sementales, poder compaginar su vida deportiva con su actividad reproductiva sin ningún tipo de interferencia. Por otro lado, mediante esta técnica, es posible utilizar dosis de sementales ya muertos, manteniendo así su genética. Finalmente y gracias a esta técnica, se ha podido consolidar el intercambio comercial de dosis seminales de animales de un alto valor genético, mejorando la rentabilidad y la disponibilidad de este tipo de animales (Loomis, 2001).

2.3. EVALUACIÓN SEMINAL.

La forma más efectiva para la evaluación de la fertilidad del semental es mediante la tasa de concepción y de natalidad, pero ambas son retrospectivas y están influenciadas por factores independientes de la fertilidad del semental, como son la fertilidad de la hembra y el manejo reproductivo llevado a cabo, por lo tanto, es importante tener en cuenta que la fiabilidad de la evaluación seminal como indicador de la fertilidad de un semental no es absoluta. Una baja calidad suele ser un buen indicador de subfertilidad, sin embargo, una buena calidad de semen no es garantía aceptable de fertilidad (Colenbrander, et al., 2003).

- 2.3.1. Volumen Seminal

El volumen promedio obtenido en el equino va de los 60 ml a los 100 ml (Hafez, 2002), pero pueden obtenerse volúmenes tan dispares de entre 10 ml a más de 250 ml, son varios los factores que afectan el volumen de semen obtenido en un semental como son la variabilidad individual, la raza, la edad, la frecuencia de colección, el nivel de estimulación o la época del año (Blanchard, *et al.*, 1998; Samper y Estrada, 2007).

- 2.3.2. Color del Eyaculado

La inspección visual del semen es un paso importante para evaluar el color y determinar la posible existencia de anomalías y/o contaminaciones. El color normal del semen varía de blanquecino a blanco grisáceo-crema según la

concentración espermática, pudiendo aparecer colores u olores anormales que suelen ser indicativos de problemas (Samper y Estrada, 2007).

- 2.3.3. Motilidad Espermática

La motilidad espermática es el parámetro más utilizado para valorar la calidad del semen debido a su simplicidad y bajo costo. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (MP) por eyaculado se ha asociado a la fertilidad y se considera que es un parámetro fundamental para la determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, a pesar de que no se ha correlacionado directamente con la fertilidad real (Jasko, *et al.*, 1992; Katila, 2001; Varner, 2008). En equinos un 50% de los casos y de forma fisiológica la inserción del flagelo en la cabeza es de tipo abaxial, lo que determina que el patrón de motilidad progresiva no sea tan rectilíneo como en otras especies (Dott, 1975).

- 2.3.3.1. Métodos de Evaluación de la Motilidad Espermática:

2.3.3.2. Evaluación Visual.

Es la evaluación más rutinaria, aunque poco exacta, está altamente influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, luz, osmolaridad, pH, contaminantes, etc.) y la experiencia del evaluador. Es muy importante que la técnica sea realizada correctamente y que se estandaricen las condiciones ambientales, ya que cambios en la temperatura pueden ocasionar disminución en la motilidad y por lo tanto una evaluación incorrecta de la misma, por lo que las muestras y todo el material en contacto con el semen debe permanecer a temperaturas entre 36 y 38°C, ayudándose de baños maría y platinas térmicas (Katila, 2001; Varner, 2008).

2.3.3.3. Evaluación Objetiva mediante Análisis Espermático Asistido por Computadora.

El Sistema Computarizado de Análisis de Semen (CASA) fue desarrollado en la Universidad de Pennsylvania por Liu y Warne en 1977 y perfeccionado por

Aniann y Hammerstedt en 1980. Este sistema brinda mayor objetividad y seguridad en la evaluación, permitiendo la reducción de la variabilidad entre evaluadores y una evaluación más exacta de las características del movimiento individual de los espermatozoides.

Los sistemas computarizados se basan en la captura y digitalización sucesiva de imágenes a través de un microscopio de contrastes de fases de la trayectoria de cada espermatozoide para posteriormente, interpretarse a través de un software y reflejarse en una serie de parámetros calculados matemáticamente y que representan las características de su movimiento (Verstegen, *et al.*, 2002; Varner, 2008).

- 2.3.4. Concentración Espermática

Los valores de concentración espermática media en la especie equina fluctúan entre los 150-300 X 10⁶/ml con un rango de variación muy amplio (50-800 X 10⁶/ml), la cual está afectada por la producción espermática y por la cantidad de plasma seminal en el eyaculado (Hafez, 2002).

- 2.3.4.1. Métodos de valoración de Concentración Espermática:

2.3.4.2. Hemocitómetro o Cámara de Neubauer.

Es un método directo para llevar a cabo conteos celulares, el cual requiere mucho tiempo para su realización, sin embargo es considerado como uno de los métodos de conteo más exactos. Hay varios modelos de hemocitómetros y cada uno tiene sus propias instrucciones detalladas para conteo; en términos generales es una fórmula matemática que toma en cuenta la dilución seminal, la profundidad, superficie y número de cuadros del cuadrículado observados; lo que otorga como resultado la concentración espermática de la muestra (Samper y Estrada, 2007).

2.3.4.3. Análisis Espermático Asistido por Computadora (CASA: Computer Assisted Sperm Analysis).

La determinación de concentración se realiza a través de un software conectado a un microscopio. Se usan cámaras con volúmenes ya establecidos que permitan el conteo de una muestra en monocapa de espermatozoides, lo que permite determinar la concentración por unidad de volumen, y aunque la distribución de partículas por la cámara no es uniforme, este efecto se corrige a través de fórmulas matemáticas (Douglas-Hamilton, *et al.*, 2005).

2.3.4.4. Contadores Celulares Electrónicos.

El uso de contadores celulares electrónicos como el Núcleo Counter SP-100® permite obtener resultados más exactos y repetibles que los obtenidos con la fotometría sin existir además interferencias por presencia de detritus o material contaminante. Este tipo de sistemas trabajan con la utilización de un fluorocromo de ADN (Ioduro de Propidio) que penetrará en las células espermáticas previamente lisadas por un reactivo especial (S100 en el caso del Núcleo Counter SP-100®) para su posterior conteo por fluorocromometría (Hansen, *et al.*, 2006).

2.3.4.5. Espectrofotómetro Calibrado.

El principio de estos equipos consiste en pasar un haz de luz a través de la muestra seminal, midiendo la cantidad de luz que puede atravesarla (transmitancia) o la luz que queda detenida (absorbancia), convirtiendo este valor de densidad óptica en un valor de concentración espermática, comparándola con una recta patrón realizada previamente con diluciones de semen de concentración conocida (calibración). La mayor ventaja de este tipo de equipos es que permite ahorrar tiempo y aunque es una valoración indirecta es bastante objetiva y exacta (Samper y Estrada, 2007; Blanchard, *et al.*, 1998).

- 2.3.5. Morfología Espermática

Aunque la correlación entre la morfología y la fertilidad no ha sido totalmente establecida, se ha demostrado que los sementales fértiles tienen más del 60% de espermatozoides morfológicamente normales y menos del 5% de morfoanomalías del acrosoma y pieza intermedia, y que la fertilidad se compromete cuando los niveles de morfología normal caen por debajo del 40% (Katila, 2001; Samper y Estrada, 2007).

Las anomalías morfológicas espermáticas se clasifican en primarias, secundarias y terciarias según su origen, de modo que las primeras se consideran malformaciones de origen testicular (resultado de un defecto en la espermatogénesis), las secundarias de origen epididimario (defecto en la maduración) y las terciarias de origen *in vitro* (defectos en el manejo) (Varner, 2008).

Se ha observado que determinados defectos morfológicos como las gotas citoplasmáticas y las colas dobladas tienen menor efecto sobre la fertilidad que otros como las cabezas sueltas, formas anormales de la cabeza o pieza intermedia, colas enrolladas y células germinales prematuras, por lo cual se recomienda el conteo y clasificación según su tipo de al menos 100 células espermáticas (Love, *et al.*, 2000).

- 2.3.5.1. Métodos de Evaluación de la Morfología Espermática

2.3.5.2. Tinciones

Se pueden usar diferentes tinciones como las específicas de Williams o Cassarett, las celulares generales (como Hematoxilina-Eosina, Giemsa y Wright) y las tinciones de fondo como la Eosina-Nigrosina. Esta última es la más usada por su facilidad de aplicación al semen animal, siendo utilizada también para la evaluación de la viabilidad espermática (Barth y Oko, 1989; Varner, 2008).

- 2.3.6. Evaluación de la Membrana Plasmática

La viabilidad de los espermatozoides se valora indirectamente mediante la evaluación de la integridad de la membrana plasmática, cuyo papel es vital en la regulación de las funciones espermáticas (Varner, 2008).

- Métodos de Evaluación de la Integridad de las Membranas Espermáticas:

2.3.6.1. Prueba de Hinchamiento Hiposmótico (HOST, Hypo-Osmotic Swelling Test).

Esta prueba de evaluación de integridad de membrana plasmática, fue descrito por primera vez por Drevius y Ericksson en 1966. En la cual se evalúa la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, analizando su respuesta a la exposición a un medio hipotónico (de entre 50-100 mOsm) analizando su función osmorreguladora (Jeyendran, *et al.*, 1992; Neild, *et al.*, 1999).

Por lo tanto, si la membrana está íntegra y funciona adecuadamente el espermatozoide incorporará agua de forma activa hacia el citosol, provocando cambios morfológicos en su flagelo (enrollamiento o replegamiento) asociados a esta endósmosis, dichos cambios no serán apreciados en los espermatozoides osmorregulatoriamente incompetentes (Colenbrander, *et al.*, 2003).

La prueba de HOST se ha correlacionado de forma alta con otros test predictivos de fertilidad y resultados de la prueba inferiores al 40% se han relacionado con seminales de fertilidad dudosa (Neild, *et al.*, 2000).

2.3.6.2. Tinciones Fluorescentes.

Esta técnica se basa en el uso de tinciones fluorescentes extracelulares que pueden ser no permeables, de modo que no difundirán hacia el interior de la membrana plasmática cuando ésta está íntegra, o permeables. Son soluciones fluorescentes que difunden a través de la membrana plasmática y se hidrolizan en el citosol en compuestos fluorescentes que quedan retenidos en el interior de la célula si la membrana está íntegra. Dentro de las tinciones fluorescentes no

permeables destaca el Ioduro de Propidio, y entre las tinciones fluorescentes permeables el Calcein AM o Dihidrocalcon AM, SYBR-14 o el Diacetato de Carboxifluoresceína (Varner, 2008). Actualmente se usan combinaciones de los anteriores para incrementar la información obtenida como es la combinación SYBR14/Ioduro de Propidio. Existen estudios en los que se establece una correlación entre el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (Garner y Johnson, 1995; Love, *et al.*, 2003).

2.3.6.3. Tinciones Supravitales.

El uso de técnicas de tinción no fluorescentes como la Eosina-Nigrosina para la evaluación de la viabilidad espermática, se basan en la capacidad que tiene la membrana íntegra de absorber la tinción y eliminarla (vivos), mientras que en los espermatozoides en los que la membrana no es funcional, la tinción difundirá al interior de los espermatozoides tiñendo las células (muertos), por lo tanto los espermatozoides muertos o con el acrosoma dañado se verán rosas por la eosina mientras que los vivos permanecerán blancos sobre el fondo oscuro de nigrosina. Por ello se denominan "Técnicas de *Evaluación de Vivos y Muertos*", estas tinciones permiten valorar al mismo tiempo la morfología y la viabilidad (Barth y Oko, 1989).

2.4. ENFRIADO Y CONGELACIÓN SEMINAL

- 2.4.1. AGENTES CRIOPROTECTORES

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles, que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan, este punto es la temperatura más baja a la cual puede fundir una mezcla de sólidos (A y B) con una composición fija. El descenso del punto eutéctico permitirá que se alcance una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más

deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor (Barbas, 2009).

Los agentes crioprotectores se incluyen en los medios de congelación para reducir el estrés físico y químico al que se someten los espermatozoides durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Barbas, 2009).

El poder crioprotector de un compuesto, depende tanto de su capacidad para proteger a la célula, como de no ser tóxicos para ésta. La toxicidad de los compuestos depende no solo de su toxicidad química sino también de sus efectos osmóticos, conocidos como "toxicidad osmótica", al existir una permeabilidad menor de la membrana plasmática para los crioprotectores permeables que para el agua (Gao, *et al.*, 1995).

Bioquímicamente, es posible diferenciar tres tipos de crioprotectores: 1.Los alcoholes (metanol, etanol, propanol y glicerol), 2.Azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa), 3.El dimetil sulfóxido. Además, de acuerdo a permeabilidad celular, los crioprotectores se pueden agrupar en agentes permeables y no permeables (Squires, *et al.*, 2004).

2.4.1.1 Críoprotectores Permeables.

Son compuestos de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana plasmática que producen una reorganización de los componentes lipídicos y protéicos de ésta, provocando que incremente su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación. Actúan tanto en el medio intracelular como extracelular (Keith, 1998).

2.4.1.1.2 Glicerol

El glicerol fue descubierto por Polge y colaboradores en 1949 y desde entonces se convirtió en el crioprotector de elección para la criopreservación de semen en muchas especies, entre ellas la equina. Es todavía el crioprotector más usado pero no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, que varía del 2,5 al 7%. En cualquier caso depende de la composición del diluyente y del porcentaje de yema de huevo o del mismo (Vidament, *et al.*, 2000, 2001; Loomis y Graham, 2008).

Además presenta un claro efecto negativo pudiendo ser uno de los factores implicados en la baja motilidad y fertilidad postdescongelación que ha sido descrito en aves pero también en equinos (Vidament, 2005). Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, en la membrana, en las proteínas superficiales que intervienen en la señalización celular, a la polimerización tubular y en la asociación de microtúbulos, además de provocar desnaturalización de proteínas (Fahy, *et al.*, 1990). La sensibilidad de los espermatozoides al glicerol es especie dependiente (Curry, 2000), estando completamente contraindicado su uso en algunas especies como el gallo.

En equinos se ha visto que se producen efectos tóxicos si se usa en concentraciones mayores o iguales al 2,5% (Bedford, *et al.*, 1995) o 3,5%, teniendo en cuenta que la concentración final de glicerol dependerá de la dilución usada semen:diluyente (Vidament, 2005). Además también existe variabilidad individual respecto a la tolerancia al glicerol entre sementales, que podría estar relacionada en parte con la variabilidad en la fluidez de membrana de los espermatozoides ya que se sabe que el glicerol afecta directamente a esta fluidez (Alvarenga, *et al.*, 2003).

El principal efecto tóxico del glicerol parece estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación (Squires, *et al.*, 2004).

2.4.1.2. Crioprotectores Permeables Alternativos

Entre los crioprotectores alternativos destacan los pertenecientes al grupo de las amidas que han sido utilizadas como crioprotectores de semen únicos o en combinaciones con glicerol en equinos para disminuir el efecto tóxico del glicerol y mejorar la motilidad, viabilidad y fertilidad del semen congelado-descongelado (Alvarenga, *et al.*, 2000; Medeiros, *et al.*, 2002;).

Las amidas que han dado mejores resultados para su uso como crioprotectores en semen equino son la dimetilformamida (DMF) y metilformamida (MF) con un peso molecular de 73,09g/mol 50,07g/mol respectivamente (Alvarenga, *et al.*, 2005).

2.4.1.3. Crioprotectores no Permeables.

Los crioprotectores no permeables son compuestos de elevado peso molecular que no tienen la capacidad de atravesar la membrana plasmática, por lo que su efecto protector lo desarrollan en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos favoreciendo un medio hipertónico que hace que salga agua de la célula (deshidratación), disminuyendo así la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Moore, *et al.*, 2006).

2.4.1.3.1. Yema de Huevo

Los fosfolípidos y lipoproteínas procedentes de la yema de huevo son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al daño desencadenado en la congelación espermática. Hoy en día se sabe que la fracción de lipoproteínas con efecto crioprotector en la yema de huevo es la fracción de baja densidad (LDL's) (Bencliarif, *et al.*, 2008; Hu, *et al.*, 2010).

2.4.1.3.2. Leche Descremada

Las caseínas, fosfocaseínas y las beta lacto globulinas procedentes de la leche son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al shock frío, sirviendo la leche descremada como constituyente básico del diluyente o

formando parte en pequeñas cantidades de diluyentes sintéticos (Holt, 2000; Aurich, *et al.*, 2007).

2.4.1.3.3. Azúcares

El plasma seminal presenta de manera natural azúcares como son la glucosa, fructosa y el sorbitol. De entre ellos la glucosa y la fructosa son los azúcares más empleados en los diluyentes de congelación de semen en animales. Sin embargo se ha demostrado que en semen de equino el sorbitol muestra superioridad de efecto crioprotector frente a la glucosa y la fructosa (Pojprasath, *et al.*, 2011).

- 2.4.2. Diluyentes de Congelación:

La mayoría de los diluyentes de congelación seminal tradicionalmente usados se basaban en el diluyente de semen descrito por Kenney y colaboradores en 1975 y presentaban una mezcla de sales minerales, azúcares, EDTA, yema de huevo y/o leche descremada y glicerol. Entre ellos destacan el Lactosa-EDTA y posteriores modificaciones del mismo (Kenney, *et al.*, 1975; Tischner, 1979).

El uso de productos de origen animal presenta una serie de riesgos y limitaciones sanitarias y técnicas que han determinado que la investigación se haya centrado en su sustitución por otros medios o sustancias con dichas características protectoras (Pillet, *et al.*, 2011, 2012).

En este sentido, a partir del INRA82®, diluyente cuya base es la leche descremada, se produjo el diluyente comercial INRA96® que sustituía la leche por la fracción purificada de las caseínas presentes en la leche. La utilización del diluyente INRA96® modificado (suplementado con 2% de yema de huevo y 2.5% de glicerol) para la congelación de semen equino mostró mejores resultados que la del INRA82® para congelar (Pillet, *et al.*, 2008).

Lo mismo ha ocurrido con el uso del huevo en los diluyentes de congelación, ya que su incorporación en forma de yema de huevo completa supone una serie de problemas por la posible introducción de endotoxinas que podrían dañar los

espermatozoides y por su elevada composición lipídica y presencia de partículas groseras que interfieren en el análisis seminal (Watson y Martin, 1975).

Todo ello ha determinado que se hayan realizado estudios con yema de huevo clarificada mediante ultracentrifugación a 1000g, incorporada en el diluyente Kenney modificado de 1992 o con plasma de yema de huevo esterilizada obtenido por ultracentrifugación, que ha mostrado aportar las mismas características postdescongelación *in vitro* y de fertilidad *in vivo* que la yema de huevo completa (Pillet, et al., 2011). Este último estudio dio como resultado la creación del diluyente comercial INRAFreeze® a partir del INRA96® modificado, en el que la yema de huevo completa era sustituida por el plasma de huevo esterilizado, creando este diluyente comercial listo para su uso y sin riesgos sanitarios (Pillet, et al., 2011).

Todos los diluyentes comerciales de congelación para semen equino previamente citados presentan glicerol como crioprotector. En este sentido investigadores brasileños han estudiado la incorporación de a midas en sus diluyentes de congelación encontrando una superioridad de estos frente a diluyentes que presentan únicamente glicerol (Medeiros, et al., 2002; Alvarenga, et al., 2005).

2.5. EQUILIBRADO, REFRIGERACIÓN, CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO

En una gran mayoría de los casos es necesaria una fase de refrigeración y equilibrado tras resuspender las células espermáticas en el diluyente de congelación. Esto permite una cierta deshidratación y estabilización de las células espermáticas, debido a las diferencias de permeabilidad y peso molecular de los crioprotectores respecto a las soluciones fisiológicas. En cuanto a las tasas o curvas de congelación para semen equino, presentan varios rangos de entre los 20° a los 100°C por minuto. En cualquier caso, tanto las tasas de equilibrado y refrigeración como las de congelación deben adaptarse a la composición del

medio de congelación utilizado (tipo y concentración de crioprotectores principalmente) para optimizar los resultados obtenidos (Devireddy, *et al.*, 2002).

El protocolo de congelación inicialmente propuesto por Palmer en 1984 para el diluyente INRA82® determinaba la dilución del semen en INRA82® + 2% yema de huevo a 37°C, enfriamiento hasta 22°C en 10 minutos, refrigeración hasta 4°C en 60 minutos (velocidad de -0,55°C/min) y centrifugación a 4°C para posteriormente resuspender el pellet en el INRA82® de congelación (INRA82® + 2% yema de huevo + 2.5% glicerol) dejando que se equilibrara a esta temperatura durante 50-60 minutos para proceder a la congelación mediante congelador automático a una tasa de -60°C/min hasta los -140°C o disponiendo las pajillas a 4cm sobre vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos, para posteriormente sumergirlas en el nitrógeno líquido. A partir de este protocolo se fueron haciendo modificaciones (Vidament y col., 2000) para finalizar recomendando una primera dilución en INRA82® + 2% yema de huevo a 37°C, centrifugación y adición del diluyente de congelación (INRA82® de congelación) a 22°C, refrigeración lenta en 80 minutos hasta 4°C (-0,2°C/min), empajillado a 4°C y congelación durante 10 min a 4 cm sobre vapores de nitrógeno o en congelador programable a -60°C/min hasta los -140°C para posteriormente sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido (Vidament, *et al.*, 2001).

Este mismo protocolo es el sugerido para los diluyentes de congelación del grupo francés que se desarrollaron posteriormente: el INRA96® modificado para congelar (INRA96® + yema de huevo + glicerol) y el diluyente comercial INRAFREEZE®.

En cuanto al diluyente Lactosa-EDTA modificado, tras la centrifugación, dilución y el equilibrado a 22°C, se describe proceder a la congelación directa de las pajillas en vapores de nitrógeno líquido a una velocidad de -60°C/min o en congelador automático y posterior inmersión en el nitrógeno sin periodo de refrigeración o equilibrado previo, aunque también se han propuesto periodos de refrigeración previa lentos de aproximadamente -0,1°C/min (Heitland, *et al.*, 1996).

En el caso del diluyente Lactosa-EDTA se han estudiado protocolos con curvas de congelación rápida sin pasar por periodo de refrigeración previo o bien curvas de refrigeración lentas con período de refrigeración hasta los 5°C a -0,3 a -0,5° C/min y posterior congelación (Vlasiu *et al.*, 2008).

2.6. DAÑOS PRODUCIDOS EN EL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA CRIOPRESERVACION

El proceso de criopreservación consiste en someter al eyaculado a un enfriamiento, una congelación y posteriormente una descongelación, pasos en los que los espermatozoides sufren cambios bruscos de temperatura, que incluirán efectos negativos en la célula, todos estos efectos serán proporcionales a la velocidad de enfriamiento y al intervalo de temperaturas, a este fenómeno se le denomina shock por frío (Watson, 1981).

El "criodaño" está asociado a cambios en las propiedades termodinámicas y estructurales de la membrana plasmática que afecta a la viabilidad del espermatozoide. El choque por frío aparece cuando la temperatura cae bruscamente de 20°C a 0°C, bioquímicamente este choque produce una pérdida de proteínas y lípidos, originando daños que afectan fundamentalmente a la membrana plasmática y acrosomal.

Durante el proceso de congelación, todas las membranas espermáticas son susceptibles de sufrir daños, tanto la membrana plasmática, como las membranas acrosomales y mitocondriales (Watson, 1995). Las membranas del espermatozoide son únicas con respecto a la composición de fosfolípidos y colesterol. La membrana plasmática está formada por una bicapa lipídica fluida compuesta principalmente por lípidos polares asociados con numerosas proteínas (Erwin, 2004). Aunque los lípidos y las proteínas presenten asociaciones entre ellos dando lugar a una configuración determinada, no es tan covalentemente unidos y si la membrana sufre algún estrés, estas asociaciones pueden alterarse,

cambiando la configuración de la membrana y dando lugar a una función anormal e incluso a su ruptura (Parks, 1992). De este modo, cuando las membranas se enfrían por debajo de la temperatura de transición de los lípidos que las componen, se produce un cambio de fase del estado semilíquido a estado de gel, y empiezan a agruparse formando microdominios (Holt y North, 1986 y 1991). Esto favorece las asociaciones al azar con otros lípidos y la formación de uniones entre estos, así como de zonas muy inestables entre los dominios lipídicos entre el estado de líquido y de gel, lo que facilita la ruptura de la membrana, estos eventos de cambio de fase se revierten tras la descongelación aunque en muchas ocasiones no todos los lípidos y proteínas vuelven a su localización original (Amann, 1999). En este caso, las proteínas quedan atrapadas entre los lípidos al producirse una alteración en la organización de éstos. Por ello, si estas proteínas son canales iónicos y se altera su estructura, afectará a la funcionalidad de la membrana (Watson, 2000). Por lo tanto, la permeabilidad se ve modificada por la disminución de la temperatura, pudiendo ser debido a una ruptura de la membrana, aunque también es posible que se deba a que sus canales se encuentren modificados estructuralmente; de esta forma, se ha observado que tras la refrigeración la regulación de los niveles intracelulares de calcio es anormal (Bailey, 1995).

La entrada controlada de calcio al interior del espermatozoide, tiene un papel fundamental en la regulación de procesos como la reacción acrosomal. Por otra parte, en la membrana plasmática del espermatozoide hay fosfolípidos que están orientados hacia el interior de la bicapa y otros hacia el exterior, al producirse un reordenamiento de los componentes de la membrana debido a la exposición a las bajas temperaturas, se puede producir una orientación distinta de la normal, provocando una alteración en la estabilidad de la misma (Hammerstedt, *et al.*, 1990). Por lo tanto, la estructura de la membrana tiene que permanecer íntegra no sólo para mantener la viabilidad de la célula, sino porque la organización especial de sus componentes es imprescindible para el reconocimiento entre células y para llevar a cabo la fusión de la membrana acrosomal con la plasmática durante el proceso de fecundación (Millete, 1999).

La membrana plasmática del espermatozoide posee una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, muy susceptibles a sufrir peroxidación lipídica. Cuando se produce este proceso, los ácidos grasos, que son esenciales para otorgar a la membrana la fluidez que necesita, se modifican. Una alta peroxidación lipídica produce la disminución de la motilidad espermática y de la capacidad fertilizante, pérdida de enzimas intracelulares y daño estructural de la membrana, particularmente en la región apical (acrosoma). Los procesos de criopreservación aumentan la peroxidación lipídica y por lo tanto provocan una pérdida de funcionalidad del espermatozoide (Aitken, 1995; Chatterjee, 2001).

Igualmente, las grandes fluctuaciones de volumen producidas como consecuencia del estrés osmótico sufrido por los espermatozoides durante la criopreservación, producen numerosos daños en diferentes compartimentos celulares como la membrana plasmática, el citoesqueleto y las mitocondrias. Igualmente, las condiciones de hipertonicidad inducen una rápida despolimerización de la actina F y remodelación del citoesqueleto de actina, tanto en células somáticas como en el espermatozoide (Pommer, 2002; Correa, 2007).

Actualmente, el conocimiento que se tiene sobre el papel que desempeña el citoesqueleto en la osmorregulación sigue siendo incierto, sin embargo hay evidencias de que actúa como un sensor del volumen celular y que ofrece protección mecánica contra un excesivo aumento o disminución de volumen celular. Las mitocondrias juegan un papel muy importante en diversas funciones celulares como, la producción energética de la célula, modulación del estado redox, la regulación osmótica y la homeostasis del calcio. Las mitocondrias al ser organelos tan importantes tanto estructural como funcionalmente, se convertirán en organelos altamente sensibles a daños durante el proceso de criopreservación (Burg, *et al.*, 2007).

Uno de los inconvenientes de la criopreservación, es que puede dar como resultado una población parcialmente dañada (espermatozoides con daños subletales), en la que se observa motilidad espermática. Esta subpoblación

presenta un cierto grado de alteración de la membrana y de la función mitocondrial, lo cual da como resultado un bajo metabolismo energético y una excesiva pérdida de energía, quedando los espermatozoides incapacitados y sin capacidad fertilizante en pocas horas. Siendo este un factor crítico en especies como la equina que presenta estros muy largos. Si el intervalo que transcurre entre la inseminación y la ovulación es superior a la vida media del semen descongelado, difícilmente se producirá la fecundación (Oehninger, *et al.*, 2000).

Durante mucho tiempo se tuvo la creencia que la corta vida media de los espermatozoides tras la congelación y descongelación, era debida a fenómenos de capacitación prematura. Posteriormente, se observó que los cambios que se producen, aunque son similares a la capacitación, son diferentes a ésta. Por eso los cambios que se producen durante la criopreservación deben ser considerados como fenómenos diferentes a los observados en la capacitación (Watson, 2000).

La criopreservación también origina cambios en las propiedades de la membrana interna mitocondrial, alterando el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial. Esto causa una disfunción del ciclo de Krebs, produciendo la reducción en la producción de ATP y liberación de factores pro-apoptóticos al citoplasma. En trabajos llevados a cabo con espermatozoides como modelo celular, también se ha observado que la congelación conduce a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, a disminución de los niveles de ATP y a la liberación de factores pro-apoptóticos al citoplasma (Martin, *et al.*, 2005; Schober, *et al.*, 2007).

También se han observado daños en el núcleo del espermatozoide debido a la criopreservación, daños que producen descondensación de la cromatina. Por lo cual se ha observado que empleando semen congelado existe una mayor probabilidad de muerte embrionaria, debido a los daños producidos en el ADN durante el proceso de congelación y descongelación (Royere, *et al.*, 1996).

En lo que se refiere al espermatozoide equino, este es extremadamente sensible al shock por frío, cuando se enfría desde aproximadamente los 37°C hasta los 8°C a

una velocidad $>0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los efectos producidos por el shock por frío, cuando la velocidad de enfriamiento es $>0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$., incluyen patrones anormales de movimiento (movimiento circular), rápida pérdida de motilidad, daños en el acrosoma y membrana plasmática, reducción del metabolismo y la pérdida de componentes intracelulares (Moran, *et al.* 1992; Amann y Picket, 1987).

3. JUSTIFICACIÓN.

Es importante considerar que con el paso de los años, el uso de la Inseminación Artificial en la industria caballar ha sido cada vez más utilizada alrededor del mundo, por lo que es de suma importancia que se estudien cada vez más los protocolos de congelación seminal dentro de lo que se incluye: agentes crioprotectores, diluyentes, tasas de enfriado y congelación, entre otros. Todo esto con el afán de hacer cada vez más extensiva la práctica de la Inseminación Artificial en los equinos, tratando de disminuir los efectos nocivos a los que se enfrentan los profesionales dedicados a esta especie como la raza, la edad del semental, la temporada reproductiva y la variación individual entre sementales de la misma raza; todo esto para que se aseguren protocolos cada vez más personalizados para los sementales y disminuir lo más posible los animales “Bad Freezers”.

4. HIPÓTESIS

Si el enfriado lento pre congelación a -3°C permite que la membrana plasmática de los espermatozoides equinos atraviese el cambio de transición de fase con menor daño que el observado con el enfriado tradicional, entonces se tendrá un mejor resultado, *in vitro*, de la capacidad fertilizante de estos espermatozoides.

5. OBJETIVOS.

5.1. General.

Evaluar el efecto del cambio de temperatura pre congelación sobre la criosupervivencia espermática.

5.2. Particular.

Evaluar las características estructurales y funcionales de los espermatozoides de equino mediante viabilidad, estado de capacitación e inducción de la reacción acrosomal al descongelado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 2 de Reproducción y Etología Animal, perteneciente a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM. Este campus se localiza en el km 2.5 de la Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, colonia San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Se utilizó el semen de 5 sementales equinos de entre 5 y 11 años de edad, con las siguientes características de raza y edad:

- 1 Cuarto de Milla de 9 años.
- 1 Luso Árabe de 6 años.
- 1 Pura Sangre Lusitano de 11 años.
- 1 Pura Sangre Lusitano de 5 años.
- 1 Azteca de 7 años.

Los garañones fueron mantenidos bajo el mismo régimen de alimentación y de trabajo dentro de un mismo rancho, el cual se localiza en el municipio de Atitalaquia, Estado de Hidalgo a 2,080 metros sobre el nivel del mar, al Oeste de Pachuca con coordenadas geográficas extremas, al Norte 20°04', al Sur 19°56' de latitud Norte; al Este 99°09' y al Oeste 99°18' de longitud Oeste, con una temperatura media anual de 16.5°C y una precipitación pluvial anual de 947 milímetros. Dicho municipio colinda al Norte con los municipios de Tlaxcoapan y Tetepango; al Este con los municipios de Ajacuba y Atotonilco de Tula; al Sur con los municipios de Atotonilco de Tula y Tula de Allende; al Oeste con los municipios de Tula de Allende y Tlaxcoapan.

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento consistió de 2 fases.

1) *Primera fase. Crioconservación del semen con diferentes temperaturas de enfriado precongelación.*

Este experimento se realizó el para evaluar el efecto del enfriado lento previo a la congelación. Se utilizaron los eyaculados de los 5 ga rañones (al menos 5 eyaculados por macho), en donde el factor experimental fue la temperatura de enfriado precongelación. De cada eyaculado, se congelaron 20 pajillas (10 por cada tratamiento). El método utilizado fue el propuesto por Vidament (1975).

El enfriado comenzó a partir de 22°C hasta llegar a las temperaturas objetivo de: a) +5°C (control) y b) -3°C (experimental). La velocidad de enfriado de 22°C hasta +5°C fue de 0.15°C/min y se mantuvo el semen a dicha temperatura por un lapso de 18 horas, posteriormente se procedió a congelar las muestras del grupo control en nitrógeno líquido. Las muestras del grupo experimental fueron sometidas a un enfriado adicional para permitir el descenso de temperatura y llegar de los +5°C hasta los -3°C en un tiempo aproximado de 17 minutos con una velocidad promedio de 0.5°C/min e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. La descongelación y evaluación de las muestras se hizo en baño maría a 37°C, con un mínimo de 3 semanas en estado de congelación.

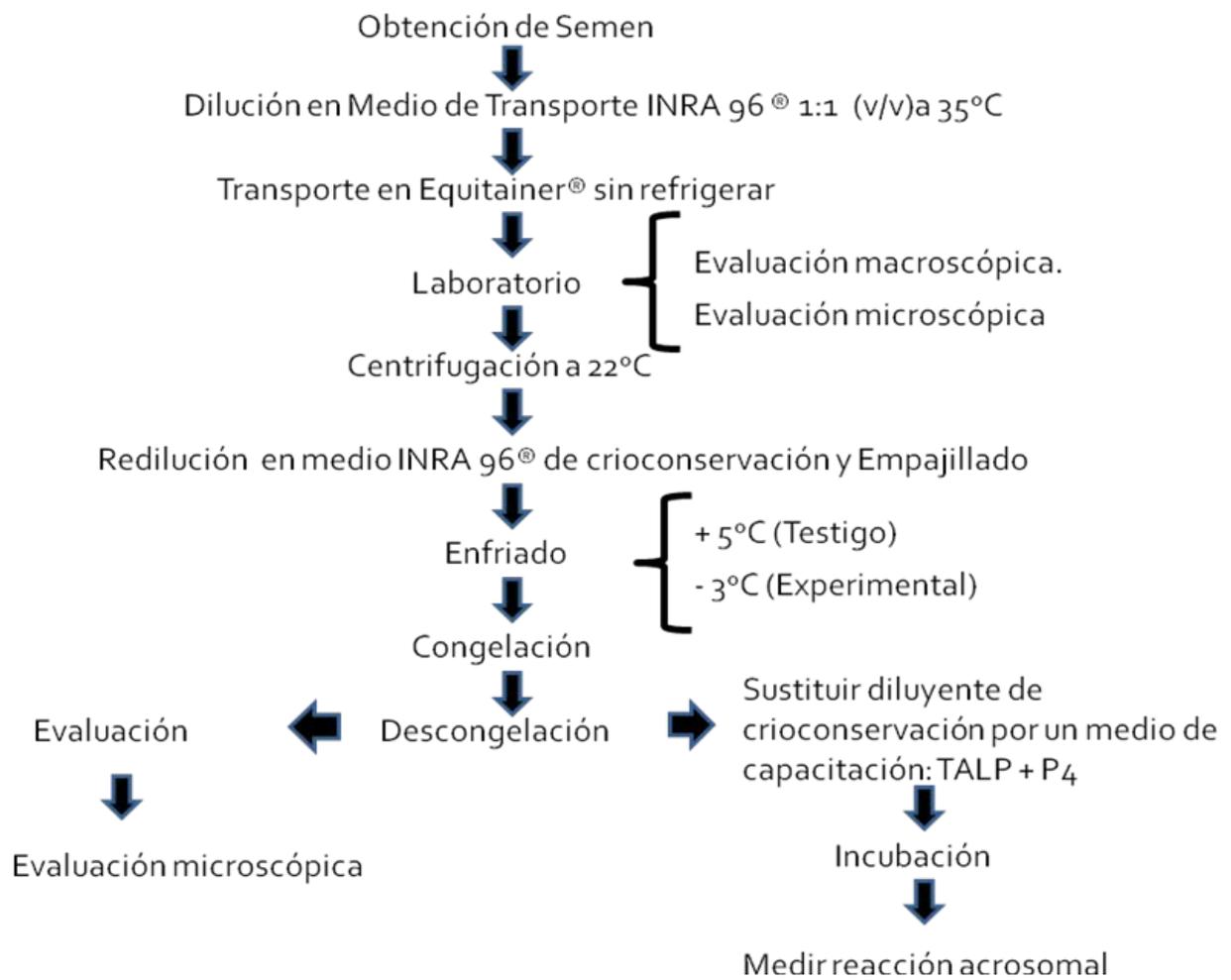
2) *Segunda fase. Evaluación indirecta de la capacidad fertilizante de los espermatozoides mediante la inducción de la reacción acrosomal con el uso de Progesterona.*

Posterior a la evaluación postdescongelado, se procedió a centrifugar las muestras para sustituir el medio de congelación con un medio de TALP modificado. Cada muestra, tanto del grupo experimental como del control se dividieron en 2 y fueron sometidas a una incubación de 4 horas con una

temperatura de 37° C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, a la mitad de cada muestra se le agregó progesterona diluida en medio TALP a una concentración de 2 µg/ml (Somanath *et al.*, 2000) y se les sometió todas las muestras (con y sin progesterona) a una incubación adicional de 30 min.

Se corrieron pruebas de evaluación espermática al inicio, a las 4 horas y al finalizar la incubación. De este modo se evaluó la posible capacidad fertilizante de los espermatozoides al descongelado.

Diagrama de Flujo del proceso experimental



6.2. Obtención del semen

El semen fue colectado de 5 garañones una vez por semana, en el periodo comprendido de Septiembre a Octubre de 2012. Las colecciones fueron realizadas con una yegua en estro y utilizando una vagina artificial tipo Missouri estándar de 16 pulgadas (Nasco, USA) con filtro. Inmediatamente después de la colecta las muestras seminales se diluyeron a razón de 1:1 (v/v) en el diluyente comercial INRA96® (IMV Technologies, Francia) precalentado a 33-35°C y se utilizó un Equitainer I® (Hamilton Research, Inc., USA) sin refrigerantes como medio de transporte al laboratorio. Este procedimiento evitó posibles cambios bruscos de temperatura y exposición de las muestras a la luz.

6.3. Evaluación microscópica seminal

Al llegar al laboratorio, se tomó la temperatura de arribo de las muestras, la cual fue en promedio de 27.3°C, con un tiempo de transporte aproximado de 2.5 horas. Se permitió que el semen se estabilizara a temperatura de cuarto (23°C aproximadamente) y posteriormente se llevó a cabo una segunda filtración para evitar cualquier impureza en la muestra. Inmediatamente se procedió a llevar a cabo la primera evaluación general microscópica la cual incluyó las pruebas de motilidad progresiva, concentración espermática, viabilidad, anomalías, estado de capacitación e integridad acrosomal.

6.3.1. Motilidad Individual Progresiva

La evaluación de la motilidad progresiva, se llevó a cabo mediante la dilución del semen 1:10 (v/v) en solución salina fisiológica (SSF, NaCl 0.9% p/v), se tomó 1 ml de semen diluido previamente 1:1 (v/v) y se mezcló con 4 ml de SSF, se puso una gota sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y se le colocó un cubreobjetos; inmediatamente después, se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X, otorgándole una calificación en porcentaje del 0 al 100% según el movimiento espermático rectilíneo progresivo de la muestra.

6.3.2. Concentración espermática

La determinación de la concentración espermática de cada eyaculado se estableció mediante el uso de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico con el objetivo de 40X. Se hizo una dilución seminal en solución salina formolada 1:200 (v/v) poniendo 0.99 ml de solución salina formolada y 10 μ l de semen diluido 1:1 v/v. Posteriormente se colocó un cubreobjetos calibrado sobre la cámara de conteo y se llenó el hemocitómetro por capilaridad con semen diluido 1:200 (v/v). El conteo se realizó en 5 de los 25 cuadros totales (1/5 parte) de cada lado de la cámara, obteniéndose un promedio y este se multiplicó por 10⁷ arrojando la concentración espermática por mililitro (Hafez, 2002).

6.3.3. Viabilidad (Integridad de la Membrana Plasmática).

Para evaluar este parámetro, se utilizaron 3 diferentes técnicas de valoración de la integridad de la membrana plasmática.

A) Tinciones fluorescentes SYBR-14/Ioduro de Propidio (PI) (Molecular Probes, EUA): Se tomó 100 μ l de cada muestra de semen y se les adicionó 5 μ l de SYBR-14 (diluido a 100 nMol en BF5), se homogenizó y posteriormente se le agregó 2 μ l de Ioduro de Propidio (12 μ Mol) volviendo a homogenizar la muestra. Por último se incorporó a la mezcla 10 μ l de una solución de glutaraldehído al 0.4% (0.17 mM), para fijar a los espermatozoides y realizar el conteo en el microscopio de fluorescencia. El conteo se realizó examinando 200 células con el objetivo de 40x y utilizando el filtro láser neón verde (543nm). En el campo se observaron espermatozoides de color verde (vivos) y naranja (muertos).

B) Tinción supravital de eosina-nigrosina: El porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (viables), se determinó a través de la observación de un frotis en el microscopio óptico con el objetivo de 100X. El frotis se realizó depositando una gota de semen diluido 1:1 (v/v) en un extremo de un portaobjetos previamente

atemperado a 27°C, se agregó una gota del colorante eosina-nigrosina y se homogenizó perfectamente. Con ayuda de otro portaobjetos se extendió el frotis formando una capa delgada y se secó inmediatamente con aire. Posteriormente se evaluó el frotis empleando el microscopio óptico, evaluando 200 células. Se registraron como muertos a los espermatozoides que se tiñeron de color rosa, de los vivos que son los que no permiten el paso del colorante y aparecen de color blanco.

C) Prueba de hinchamiento hipo-osmótico (HOST): Se tomaron 50 µl de semen diluido 1:100 (v/v) y se mezclaron con 100 µl de una solución hipo-osmótica (60 mOsm/kg) en un tubo tipo Eppendorf (siendo esta solución una mezcla de 4 partes de agua bidestilada desionizada con una parte de solución salina fisiológica al 0.9%). Se mantuvo la mezcla 5 minutos en baño maría y posteriormente se fijó con 20 µl de glutaraldehído al 0.4%. Se tomó una gota de la mezcla y se colocó sobre un portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio con el objetivo 100X. Se evaluaron 200 espermatozoides para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (hinchados) y muertos (no hinchados).

6.3.4. Anormalidades Espermáticas

El porcentaje de anormalidades se determinó a través de la evaluación de frotis de espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina, Se analizaron 200 espermatozoides por laminilla, en un microscopio óptico con el objetivo de 100X, expresándose el resultado en porcentaje de espermatozoides normales y con morfoanomalías primarias o secundarias.

6.3.5. Estado de Capacitación

Esta se evaluó con el uso del microscopio de fluorescencia y utilizando la prueba de la clortetraciclina (CTC) (Sigma, MO, USA). Se preparó la fórmula del

amortiguador y de la CTC según Green y Watson (2001) con la solución fijadora propuesta por Mattioli *et al.* (1996).

* Amortiguador CTC:

NaCl 130 mM

Tris 20 mM

La solución de CTC necesariamente debe de ser preparada antes de cada experimento y cuenta con los siguientes componentes y características:

CTC-HCl 805 mM

Cisteína 5 mM

pH 7.8

Posteriormente, se agregó 100 μ l de solución CTC a 100 μ l de semen y se homogenizaron durante 30 segundos, después se añadieron 22 μ l de solución fijadora de glutaraldehído al 0.2%. Posteriormente, se preparó la laminilla muestra con 10 μ l de la mezcla y se le añadieron 10 μ l de DABCO (1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (Sigma-Aldrich®, USA) 220 mM, disuelto en glicerol y PBS (9:1) v/v) colocando un cubreobjetos y ejerciendo presión suave. Las laminillas fueron observadas al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100x y utilizando el filtro láser neón azul (488 nm); se evaluaron 200 células por laminilla. De este modo se determinó el porcentaje de presentación de los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide de acuerdo a la clasificación utilizada por Kaneto *et al.* (2002):

Patrón F. "Full" - Fluorescencia total, patrón en espermatozoides no capacitados.

Patrón B. "Band" - Una banda libre de fluorescencia en el dominio postacrosomal, patrón en espermatozoides capacitados con acrosoma intacto.

Patrón AR. "Acrosome Reacted" - Ausencia total de fluorescencia en la cabeza, baja fluorescencia en la totalidad de la cabeza con una banda fluorescente

brillante a lo largo de la región ecuatorial o presencia de fluorescencia únicamente en la región postacrosomal; patrones de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal completada.

6.3.6. Integridad Acrosomal

Para la evaluación de la integridad acrosomal se utilizó la lectina del chícharo (PSA *Pisum sativum agglutinin*) unida al fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC). La metodología consistió en la preparación de frotis seminales secados al aire, los cuales se fijaron durante una hora en etanol, posteriormente se le agregaron 50 µl (al 6.5 mM) de la solución de lectina + FITC en la superficie a cada frotis, se distribuyó uniformemente en la muestra y fue mantenido en una cámara húmeda y en oscuridad durante 10 minutos. Enseguida los frotis fueron lavados con agua destilada y secados al aire, se agregó una gota de DABCO (1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano (Sigma®, USA) 220 mM, disuelto en glicerol y PBS (9:1) v/v) para retardar la pérdida de fluorescencia y se le colocó un cubreobjetos ejerciendo presión suave. Posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 100X y usando el filtro láser neón verde (543 nm), observándose 200 células por frotis y evaluando la uniformidad del borde apical de la cabeza del espermatozoide. Se obtuvo el porcentaje de los 2 patrones distintos: espermatozoide con acrosoma intacto y espermatozoide con acrosoma dañado.

6.4. Dilución seminal

Posterior a la evaluación microscópica inicial, se procedió a centrifugar el semen a 600g por 15 minutos (Vidament, *et. al.* 2000, Maarten Hoogewijs *et al.*, 2010) a temperatura ambiente. Dicho procedimiento para retirar todo el plasma seminal, se dejó únicamente el paquete celular y se le agregaron 2 ml de diluyente INRA96® (IMV Technologies, Francia) y se cuantificó nuevamente la concentración espermática ahora en esos 2 ml finales. Dicho procedimiento se llevó a cabo para

poder ajustar la concentración final de envasado a 200×10^6 células motiles /ml del siguiente modo:

$$\text{Número de dosis} = \frac{(\text{Volumen}) (\text{Concentración}) (\text{Porcentaje de células móviles})}{\text{Número de células móviles requerido por dosis}}$$

Número de dosis \times 0.5 ml = Volumen final de semen con diluyente para criopreservación.

6.4.1. Diluyente Criopreservador

Al conocer el volumen final para la elaboración de las dosis deseadas, se procedió a agregar el diluyente para criopreservación que se requería del siguiente modo:

1.- Se preparó yema de huevo clarificada, lo cual consistió en la obtención de la yema de un huevo de gallina, estando el cascarón perfectamente limpio y desinfectado. Se tomaron 5 ml de la yema de huevo y se mezclaron con 4 ml de INRA96® (IMV Technologies, Francia) (dilución 5:4 v:v), se sometió la mezcla a centrifugación de 500g por 10 minutos y se recuperó el 90% del sobrenadante, el cual fue usado como yema de huevo clarificada.

2.- Se elaboró el diluyente para criopreservación el cual consistió de 91% de INRA96® (IMV Technologies, Francia) + 4% de yema de huevo clarificada + 5% de Glicerol (SIGMA, USA).

3.- Se agregó diluyente INRA96® (IMV Technologies, Francia) a la suspensión de espermatozoides hasta completar el 50% del volumen final requerido.

4.- El otro 50% fue completado con diluyente para criopreservación el cual se agregó en 3 fases (del 16.6% del volumen final) con una diferencia de 5 min entre

cada una de ellas para permitir la adaptación progresiva de los espermatozoides al criopreservador y así reducir el efecto tóxico del mismo.

De este modo se obtuvo una concentración final de 2% de yema de huevo y 2.5% de glicerol en la solución con espermatozoides previo al envasado. (Vidament, *et al.*, 2000)

6.5. Envasado

Se procedió a envasar el semen en pajillas de plástico con capacidad de 0.5 ml, las cuales fueron llenadas de forma manual usando un peine para empajillado dejando un extremo de la pajilla con aire para evitar la ruptura de la misma en el descongelado. Las pajillas se sellaron usando alcohol polivinílico y agua destilada.

6.6. Enfriado Precongelación

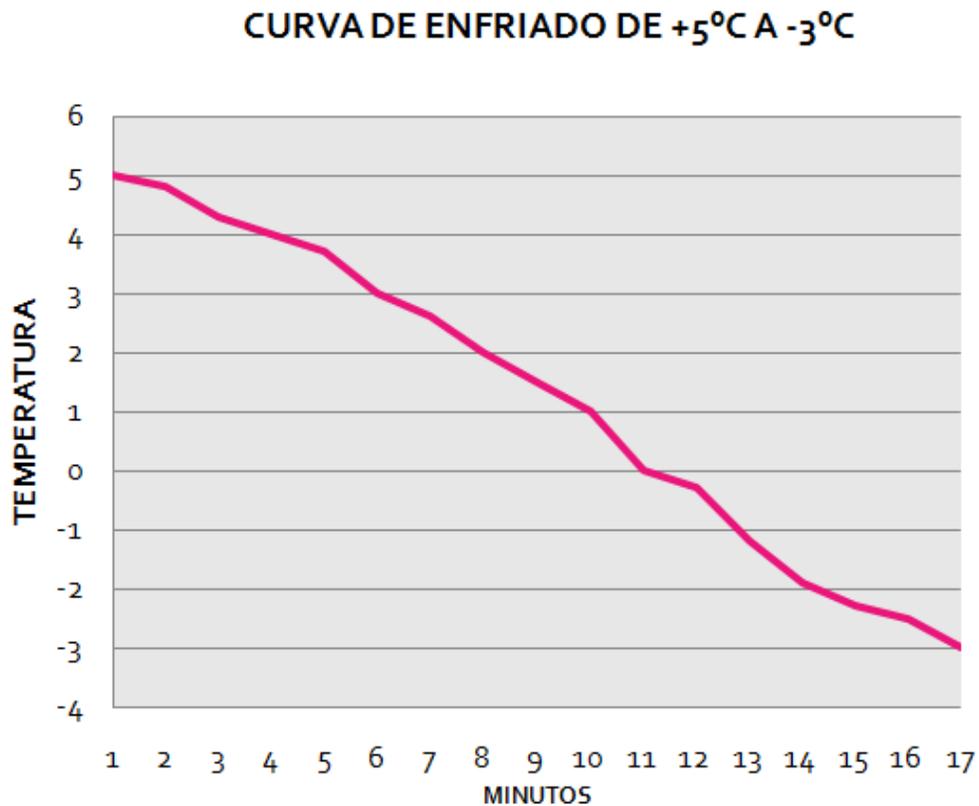
a) Enfriamiento lento de los +22°C hasta los +5°C de las pajillas control y experimentales.

Para realizar el enfriamiento se utilizó un recipiente de vidrio (Recipiente "1") con capacidad de 650 ml, del cual la tapa contaba con 6 orificios para instalar 6 tubos de vidrio con capacidad de 10 ml y se llenó con una solución salina al 9.85%, misma que se encontraba a temperatura ambiente al iniciar el enfriado. Las pajillas (tanto del grupo experimental como del grupo control) fueron colocadas en grupos de 10 en cada uno de los tubos, impidiendo que la solución salina tocara las pajillas y estas únicamente tuvieran contacto con el aire permaneciendo secas. También se instaló a una pajilla monitor la sonda de un termómetro digital Traceable® (VWR, USA) para permitir el constante monitoreo del descenso de temperatura; el recipiente se introdujo en un refrigerador y las pajillas llegaron a los +5°C en un tiempo aproximado de 2 horas, a una tasa de enfriado de 0.15°C, y

se dejó que permaneciera en refrigeración alrededor de 18 horas (Vidament, et al., 2000).

b) Enfriado rápido de los +5°C a los -3°C de las pajillas del grupo experimental.

Al cumplir las 18 horas en refrigeración el recipiente 1 se metió en una hielera que contenía hielo salino al 9.85%, a una temperatura de -11°C (Recipiente "2") hasta cubrirse totalmente. Las pajillas se siguieron monitoreando y alcanzaron la temperatura de -3°C en un tiempo aproximado de 17 minutos a una tasa de enfriado de 0.5°C/min; este sistema de enfriado se ha validado previamente en este laboratorio Ríos *et al.*, (2005).



6.7. Congelación

Al concluir el enfriado de las pajillas de cada tratamiento, se colocaron sobre una rejilla dentro de un recipiente de poliestireno de 33x18x16 cm, el cual contaba con una cama de 8 cm de nitrógeno líquido. Las pajillas se expusieron a los vapores de nitrógeno (-80 a -100°C) durante 12 minutos a una altura de 4 cm, finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196°C) y se procedió a almacenarlos en un termo criogénico.

6.8. Descongelación

Las pajillas fueron descongeladas en un baño maría a 37°C durante 35 segundos, se secaron y fueron cortadas por el extremo donde se selló con alcohol polivinílico, el contenido de cada pajilla se vació en tubos tipo Eppendorf que se encontraban en el mismo baño maría. Se procedió a realizar la segunda evaluación microscópica de cada muestra, la cual consistió realizar las pruebas de motilidad progresiva, viabilidad, anormalidades, estado de capacitación e integridad acrosomal, del mismo modo como se explicó anteriormente.

Segunda fase del experimento.

Para conocer las características de las muestras al descongelado, se procedió a verter el contenido de una pajilla a un tubo tipo Eppendorf y someter la muestra a una centrifugación rápida de 6 00g durante 5 minutos a temperatura ambiente, para poder retirar el medio de congelación (91% de INRA96® (IMV Technologies, Francia) + 4% de Yema de Huevo Clarificada + 5% de Glicerol [SIGMA, USA]). Al concluir el centrifugado se retiró el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en un medio de Tyrode modificado-TALP (Parish *et al.*, 1988) hasta completar el volumen original de 500 µl. Cada pajilla se dividió en 2 partes tanto en el caso de las del grupo control como de las experimentales y cada una de las

mitades fue colocada en un tubo Eppendorf quedando un volumen final de 250 μ l con una concentración espermática de 40×10^6 células en promedio.

Posteriormente los tubos fueron metidos a una incubadora de CO₂ (IncuSafe SANYO E&E America Company, USA) con un ambiente de 5% de CO₂ a 37°C. La incubación se llevó a cabo en 2 etapas: en la primera se dejaron las muestras durante 4 horas de incubación. Previo al inicio de la segunda etapa, se preparó una solución de progesterona de 0.1 μ g/ μ l, la cual se realizó utilizando progesterona hidrosoluble (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin 70 mg/gr. Sigma-Aldrich, USA), se tomaron 14.3 mg de la progesterona y se diluyeron en 1 ml de TALP, dando una concentración final de progesterona de 1 mg/ml. Posteriormente se tomaron 10 μ l de esta solución y se diluyeron en 90 μ l de TALP, dando como resultado una solución con 0.1 μ g/ μ l de progesterona.

Cuando se cumplió el tiempo de incubación inicial, comenzó la segunda etapa de incubación, en la se procedió a agregar progesterona a una razón de 2 μ g/ml (Somanath *et al.*, 2000) a una mitad de cada muestra. Esto se logró diluyendo 5 μ l de la preparación de progesterona en los 250 μ l de semen incubados, por lo cual se logró una concentración final de 0.5 μ g de progesterona en los 250 μ l, cumpliendo con el requerimiento final de 2 μ g/ml de progesterona. Igualmente se dejó la otra mitad del semen descongelado únicamente con medio TALP, al mismo tiempo que se tomaron muestras para una tercera evaluación microscópica para poder hacer el monitoreo del efecto de la primera etapa de la incubación. Y por último se dejaron todas las muestras por un lapso adicional de 30 minutos.

En cuanto se cumplió el tiempo de la segunda parte de incubación, se procedió a correr pruebas a cada muestra (con y sin progesterona) las cuales incluyeron motilidad progresiva, viabilidad, anormalidades, estado de capacitación e integridad acrosomal del mismo modo que se señaló anteriormente.

6.9. Análisis estadístico

Los datos de los espermatozoides en fresco diluidos y posterior a la centrifugación/ redilución de cada macho fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) empleando el modelo general lineal del paquete Statistica para Windows 5.5 software (StatSoft Inc., Tulsa OK, USA, 2000). Los datos de las variables expresadas como porcentajes fueron transformados al arcoseno previo al ANOVA. Para comparar medias se empleó la prueba de Tukey. Los datos de la calidad espermática al descongelado (enfriado a +5°C vs. -3°C) así como los datos provenientes de la incubación (sin vs. con progesterona), fueron analizados mediante comparaciones de pares (prueba "t") empleando el paquete Statistica para Windows 5.5 software.

7. RESULTADOS

Las variables del semen fresco (diluido en INRA96 después de la recolección, transportado a 30° C y atemperado a 23°C, aproximadamente) revelaron diferencias significativas entre machos en cuanto a la viabilidad (EN), funcionalidad de la membrana plasmática (HOST), motilidad progresiva y anomalías secundarias (Cuadro 1).

Después de la centrifugación y resuspensión de los espermatozoides en INRA96 (2.5% concentración final de glicerol), hubo diferencias entre machos en la motilidad progresiva, viabilidad (EN), integridad de la membrana plasmática (SYBR14/PI), funcionalidad de la membrana (HOST), espermatozoides no capacitados (Patrón F, prueba CTC) y los espermatozoides con reacción acrosomal (Patrón AR, prueba CTC) (Cuadro 2).

Al descongelado, no hubo diferencias entre tratamientos de enfriado pre-congelación (+5°C vs -3°C) en la motilidad progresiva, viabilidad (EN),

funcionalidad de la membrana (HOST), integridad del acrosoma y el estado de capacitación. Sin embargo en lo que respecta a la integridad de la membrana plasmática (SYBR14/PI) si hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$, Cuadro 3). Hubo diferencias significativas entre algunos machos en la motilidad progresiva, viabilidad, integridad y funcionalidad de la membrana, y en los espermatozoides capacitados (Patrón B, prueba CTC) y con reacción acrosomal (Patrón AR, prueba CTC) (Gráficas 1-8).

Para la etapa de incubación con y sin progesterona se descongeló un grupo de pajillas de cada tratamiento de enfriado, diferente al empleado para la evaluación de la etapa anterior (congelación–descongelación). De igual manera que en dicha evaluación, la motilidad no fue diferente entre tratamientos: 19 vs. 16% pero el porcentaje de células con membrana intacta si lo fue: 21 vs 18%, enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ vs enfriado a -3°C , respectivamente ($P < 0.05$, Cuadro 4).

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó a medida que el tiempo de incubación progresaba pero no hubo diferencias entre tratamientos de enfriado independientemente de la adición de progesterona: 58% (enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$) vs 58% (enfriado a -3°C). Los porcentajes de espermatozoides capacitados (Patrón B) y con reacción acrosomal (AR) aumentaron a medida que la capacitación progresaba pero no hubo diferencias entre tratamientos de enfriado independientemente de la adición de progesterona: 57 vs 59% (Patrón B), enfriado a $+5^{\circ}\text{C}$ vs enfriado a -3°C , respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 1. Características de los espermatozoides diluidos de equino en un diluyente comercial (INRA96), transportados a 30°C en un termo y atemperados a 23°C en el laboratorio.

Macho	Motilidad Progresiva (%)	Vivos Eosina-Nigrosina (%)	Vivos HOST (%)	Normales (%)	Anormalidades Primarias (%)	Anormalidades Secundarias (%)	Acrosoma Intacto (%)
1	35.0 ± 12.15a	78.4 ± 2.04a	65.9 ± 2.99ab	83.8 ± 2.09a	1.0 ± 0.23	15.3 ± 2.25a	71.1 ± 2.99
2	4.0 ± 1.70b	51.2 ± 6.95b	54.5 ± 7.26a	57.2 ± 5.77b	0.5 ± 0.22	42.3 ± 5.74b	73.5 ± 5.24
3	30.0 ± 10.88a	82.3 ± 4.80a	71.1 ± 3.34b	91.4 ± 1.69ac	0.5 ± 0.18	8.1 ± 1.71ac	75.2 ± 2.63
4	52.9 ± 13.27a	81.5 ± 1.54a	63.9 ± 3.75ab	93.7 ± 0.84c	1.0 ± 0.38	5.4 ± 0.56c	71.1 ± 1.30
5	49.2 ± 11.50a	78.8 ± 2.34a	69.6 ± 4.02b	89.6 ± 2.12ac	1.0 ± 0.31	9.6 ± 1.98ac	74.5 ± 2.60

Los valores son promedios ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas entre machos para cada característica (P<0.05).

Cuadro 2. Características de los espermatozoides diluidos de equino en un diluyente comercial (INRA96) adicionado con 2.5% de glicerol, previo al enfriado lento de 23 a 5°C.

Macho	Motilidad Progresiva (%)	Vivos SYBR/PI (%)	Vivos Eosina-Nigrosina (%)	Vivos HOST (%)	Acrosoma Intacto (%)	Patrones de la prueba CTC		
						F (%)	B (%)	AR (%)
1	65.0 ± 4.36a	63.2 ± 3.60a	69.7 ± 3.28a	59.9 ± 3.73a	65.0 ± 3.42	63.1 ± 5.42a	29.0 ± 5.21	7.9 ± 0.59a
2	8.0 ± 2.00b	39.1 ± 4.66b	40.6 ± 5.75b	42.3 ± 10.78b	72,8 ± 3.30	38.1 ± 5.01b	46.9 ± 2.53	15.0 ± 2.91b
3	37.5 ± 12.63c	67.3 ± 2.35a	77.3 ± 1.94a	61.3 ± 1.69a	73.8 ± 3.70	55.4 ± 4.12ab	37.3 ± 3.81	7.3 ± 0.59a
4	67.1 ± 3.76a	63.3 ± 6.70a	69.4 ± 3.25a	61.3 ± 4.44a	74.3 ± 2.12	60.2 ± 4.67a	34.4 ± 4.69	5.4 ± 0.70a
5	70.8 ± 2.39a	63.0 ± 3.79a	68.4 ± 2.50a	60.8 ± 5.30a	70.5 ± 1.88	59.0 ± 4.92ab	31.0 ± 5.11	10.0 ± 1.86ab

Los valores son promedios ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas entre machos para cada característica (P<0.05).

Cuadro 3. Efecto del enfriado lento a dos temperaturas blanco sobre las características de espermatozoides de equino al descongelado.

Temperatura Pre-congelación	Motilidad Progresiva (%)	Integridad de la MP SYBR/PI (%)	Viabilidad Eosina-Nigrosina (%)	Funcionalidad de la MP HOST (%)	Acrosoma Intacto (%)	Patrones de la prueba CTC		
						F (%)	B (%)	AR (%)
+5°C	11.2 ± 2.41	22.0±2.16a	46.0 ± 2.93	13.8 ± 1.51	62.8 ± 3.51	24.5 ± 2.74	53.0 ± 3.12	22.5 ± 3.35
-3°C	10.6 ± 2.84	17.4±2.08b	45.5 ± 2.51	13.5 ± 1.89	66.0 ± 2.65	24.5 ± 2.73	53.7 ± 3.28	21.8 ± 2.95

Los valores son promedios ± error estándar. Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas (P<0.05).
MP= Membrana plasmática

Cuadro 4. Efecto del enfriado a dos temperaturas blanco sobre la calidad de los espermatozoides de equino incubados en TALP sin (-) o con (+) progesterona (P4) posterior a la criopreservación.

Temperatura Pre-congelación	Motilidad Progresiva (%)	Integridad de la MP			Integridad del Acrosoma (%)		
		Antes de la incubación	Incubación 4:30 hrs		Antes de la incubación	Incubación 4:30 hrs	
			P4 (-)	P4 (+)		P4 (-)	P4 (+)
+5°C	18.7 ±2.2	20.8 ±1.7a*	13.8 ±1.2b	10.8 ±1.3c	65.5 ±2.6x	58.2 ±2.1y	61.6 ±2.3z
-3°C	16.4 ±2.3	17.5 ±1.8a*	11.5 ±1.1b	9.5 ±1.1c	67.2 ±2.2x	58.0 ±2.2y	61.4 ±2.3z

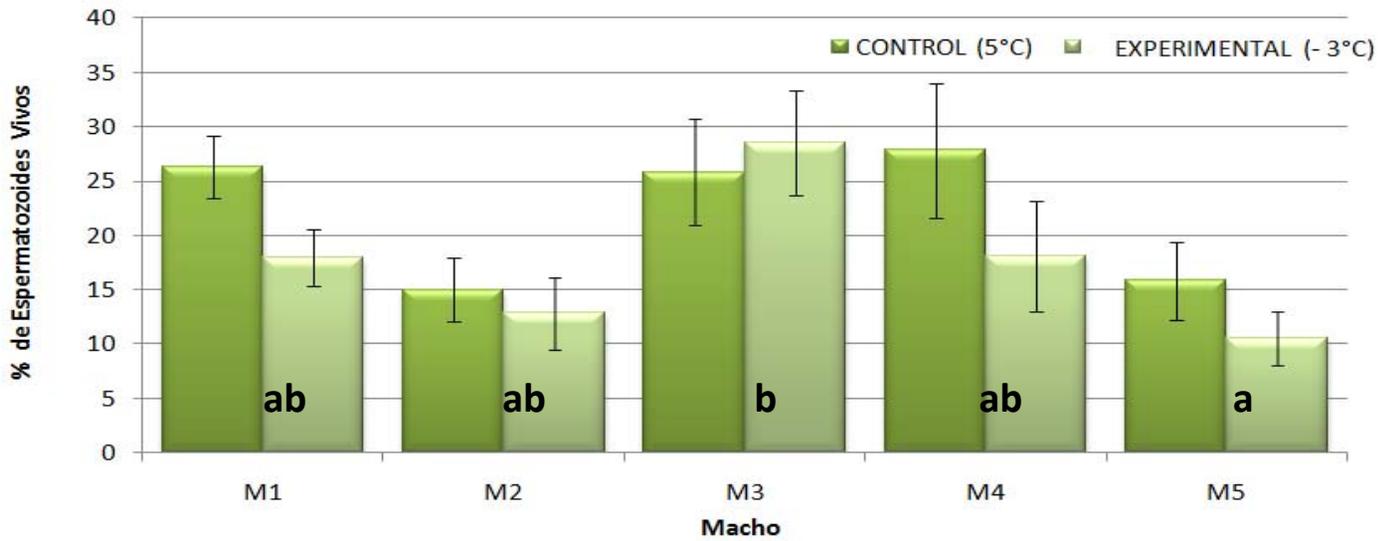
Los valores son Medias ± ee. MP= Membrana plasmática, se evaluó mediante SYBR14/PI. Letras diferentes (abc/xyz) dentro, y * entre tratamientos de enfriado indican diferencias estadísticas (P<0.05). Al descongelado, los espermatozoides fueron centrifugados para remover el medio de congelación y fueron resuspendidos en TALP.

Cuadro 5. Efecto del enfriado a dos temperaturas blanco sobre el estado de capacitación de los espermatozoides de equino incubados en TALP sin (-) o con (+) progesterona (P4) posterior a la criopreservación.

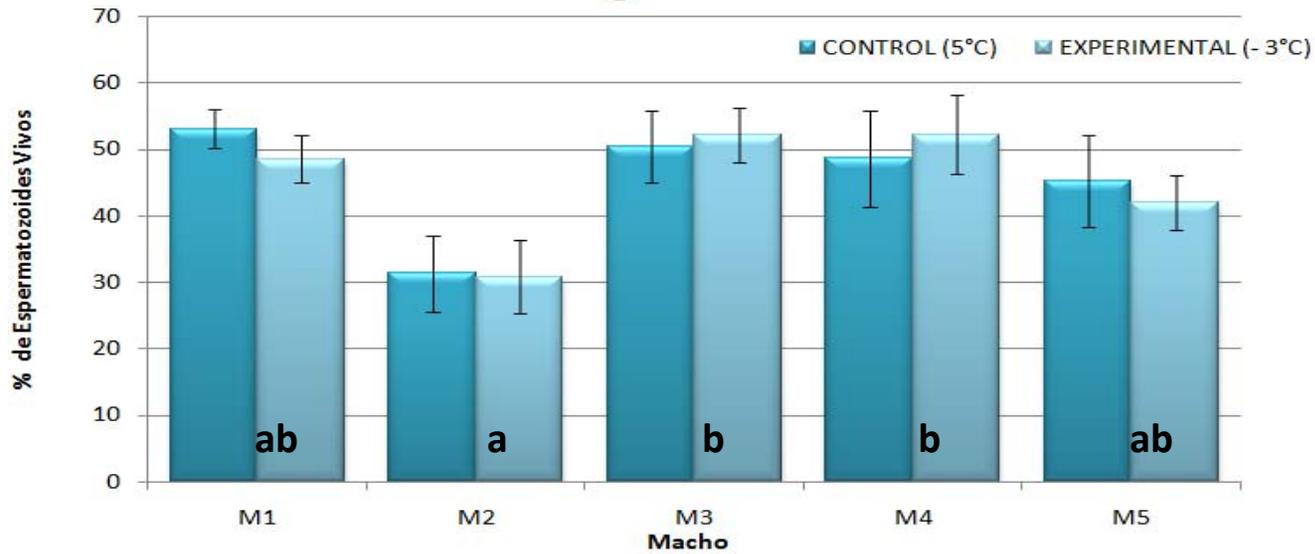
Temperatura Pre- congelación	Patrones de la prueba CTC (%)											
	Antes de la incubación			Después de la incubación por 4 horas			Después de la incubación por 4:30 horas					
	F	B	AR	F	B	AR	P4 (-)			P4 (+)		
							F	B	AR	F	B	AR
+5°C	22.7±2.8	55.7±3.1	21.7±3.0	10.1±2.1	58.4±2.0	31.6±2.2	6.8±1.2	59.2±2.0	34.1±2.3	3.8±0.5	57.0±2.1	39.2±2.4
-3°C	21.3±2.9	58.7±3.3	20.0±2.3	10.3±2.0	58.7±2.5	31.7±2.9	7.1±1.1	61.4±2.2	31.9±2.3	4.2±0.6	59.3±2.3	36.5±2.5

Los valores son medias ± ee. CTC= Prueba de C lortetraciclina. **Patrón F.** "Full" - no capacitados. **Patrón B.** "Band" - capacitados con acrosoma intacto. **Patrón AR.** "Acrosome Reacted" - capacitados con reacción acrosomal completada.

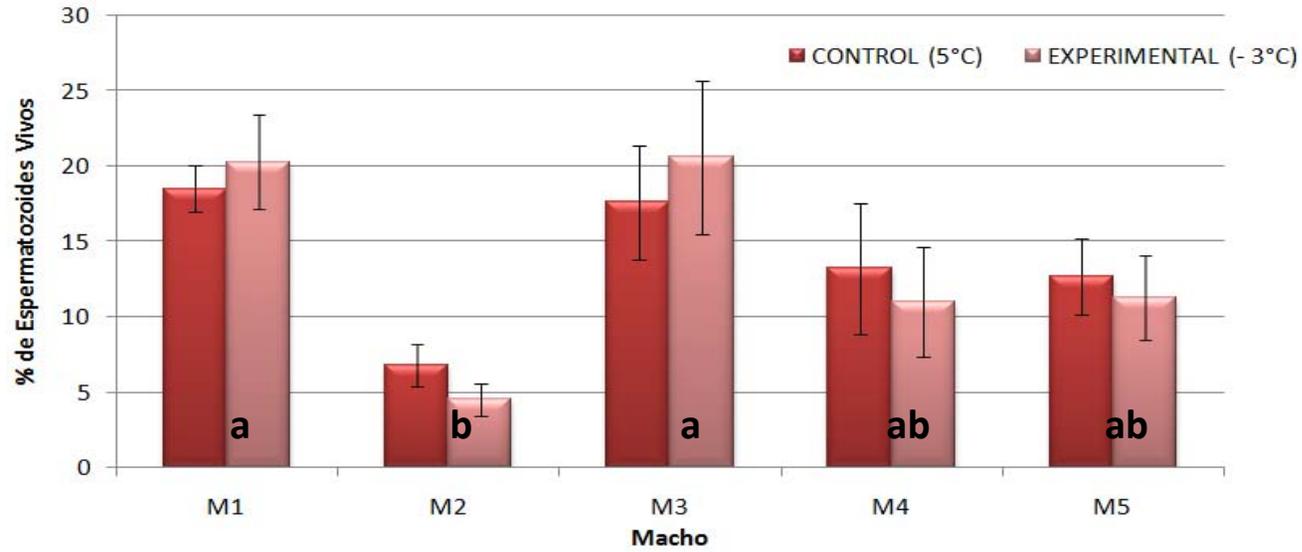
Gráfica 1. Espermatozoides Vivos, prueba SYBR14/PI.



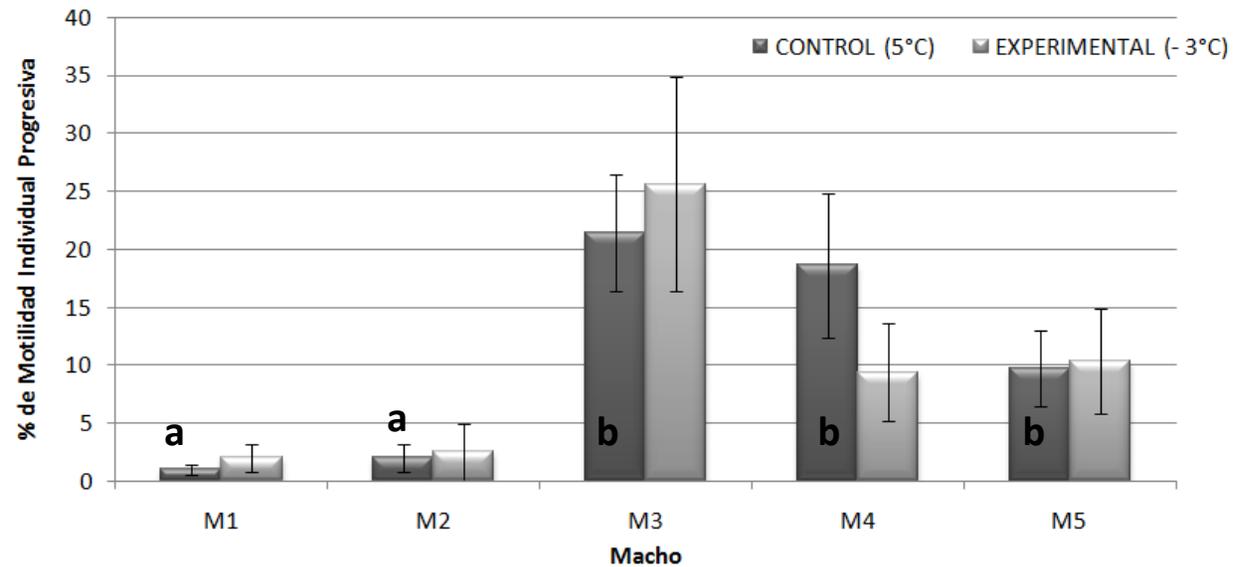
Gráfica 2. Espermatozoides vivos, prueba Eosina-Nigrosina.



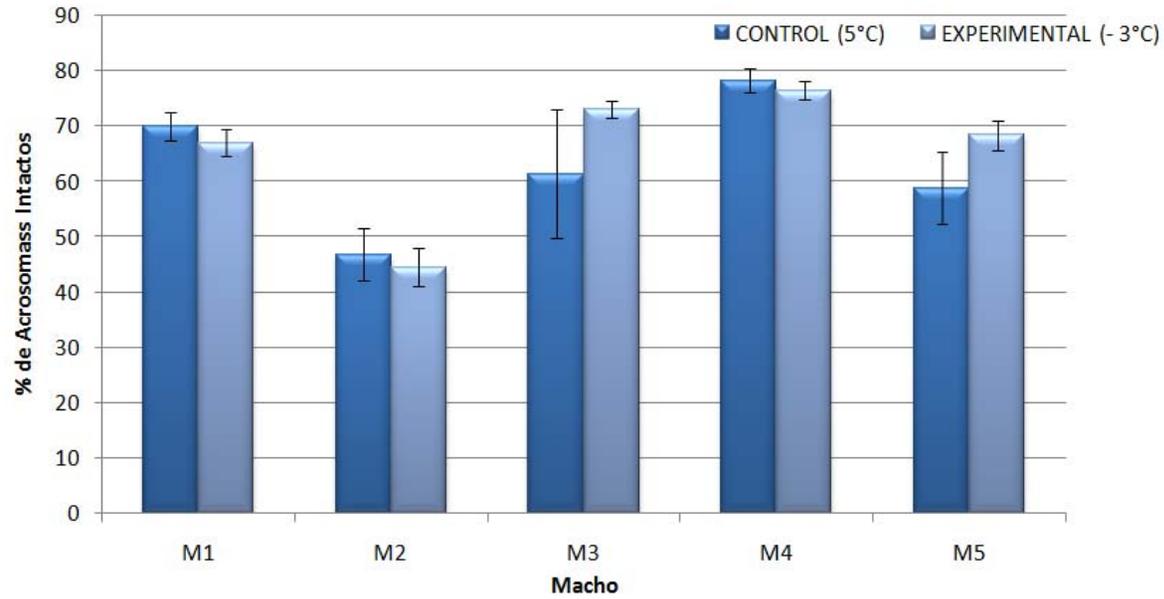
Gráfica 3. Espermatozoides vivos, prueba HOST.



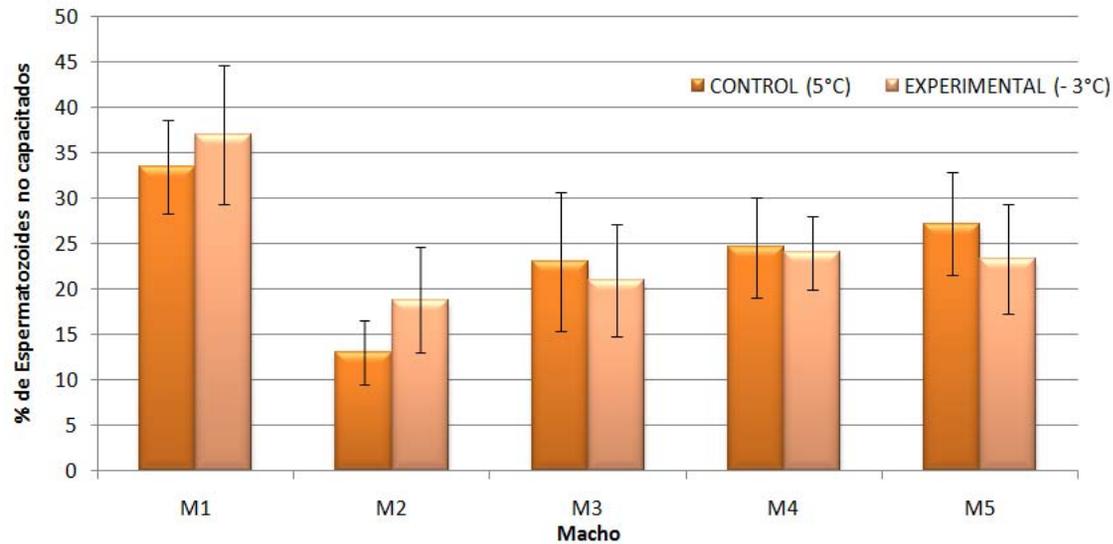
Gráfica 4. Motilidad Progressiva (%).



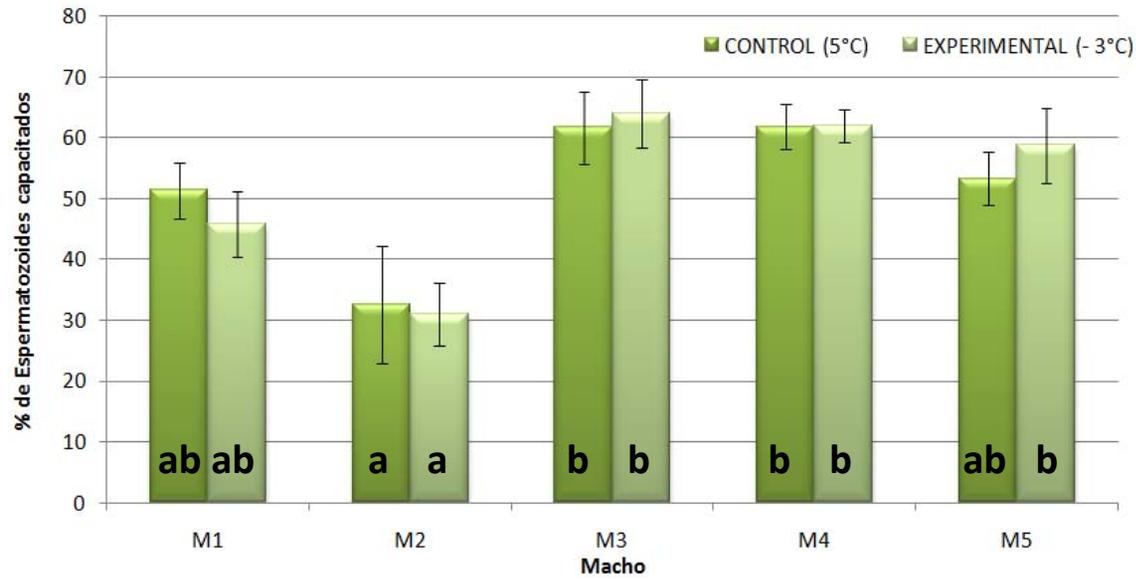
Gráfica 5. Acrosoma Intacto, prueba CTC.



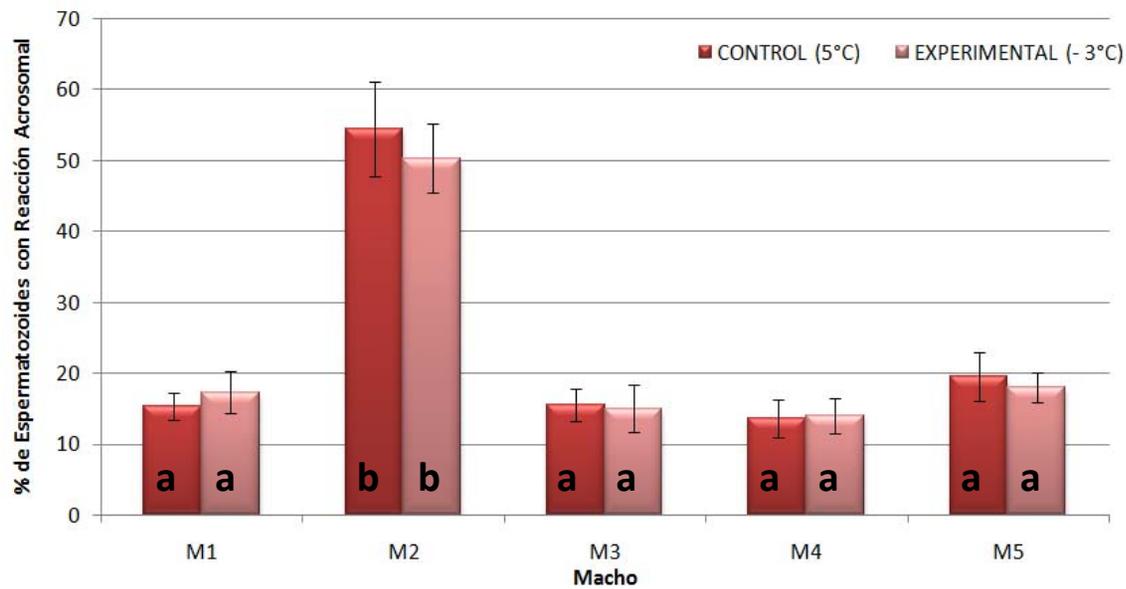
Gráfica 6. Prueba CTC, Patrón F (no capacitado).



Gráfica 7. Prueba CTC, Patrón B (capacitados).



Gráfica 8. Prueba CTC, Patrón AR (reacción acrosomal)



8. DISCUSIÓN

En este trabajo, probó la hipótesis de que el enfriado lento previo a la congelación, a una temperatura cercana a la formación del hielo del diluyente empleado (-3°C), podría mejorar la criosupervivencia de los espermatozoides de equino. Sin embargo, este enfriado no produjo los resultados esperados, en contraste con lo observado en espermatozoides de otras especies que fueron sometidos a protocolos de enfriado similares a este (caprino, Medrano *et al.*, 2001; ovino, Ríos, 2005; porcino, Garzón-Pérez *et al.*, 2010). Algunas posibles explicaciones para estos resultados contradictorios son: 1) la temperatura de enfriado que se eligió podría no ser relevante para los espermatozoides de caballo, y 2) el largo periodo de almacenamiento a 5°C antes de la congelación (17 horas) pudo dañar a los espermatozoides. En relación al primer punto, se puede argumentar que la composición lipídica de la membrana de los espermatozoides de equino es diferente a la de otras especies (Darin-Bennett y White, 1977) y por esto la temperatura de transición de fase de los lípidos de la membrana espermática, bajo cero grados centígrados, sería diferente. En relación al segundo punto, se ha reportado que los espermatozoides de equino almacenados durante 72 horas a 5°C produjeron valores de fertilidad *in vivo* aceptables (Vidament *et al.*, 2012); entonces el periodo de almacenamiento que se empleó en el presente trabajo no parece ser el responsable de nuestros resultados.

La motilidad al descongelado que se observó en nuestro trabajo se considera inaceptable para su uso en programas de inseminación artificial, para esto la motilidad debe ser $\geq 35\%$ (Vidament *et al.*, 1997). Otros autores obtuvieron valores de motilidad espermática al descongelado $\geq 30\%$ en más del 70% de los caballos cuyo semen fue congelado (Loomis y Graham, 2008); en nuestro caso ninguno de los sementales alcanzó tales valores en ninguno de los dos protocolos empleados. Otros autores, reportan valores de motilidad al descongelado de 30 a 50% (Squires *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2014), y otros reportan valores más bajos, en

el rango de 14 to 38% cuando se emplearon diferentes combinaciones de glicerol y dimetil formamida (Vidament *et al.*, 2002). Ante estos resultados los nuestros siguen siendo menores; esto nos lleva a pensar que la combinación de algunos factores propios de los sementales, del protocolo de transporte, almacenaje y criopreservación son los responsables de ello.

En relación a otras variables de los espermatozoides al descongelado, como la integridad de la membrana plasmática evaluada mediante la prueba de HOST, Saragusty *et al.* (2007) obtuvieron valores de 36.2 y 26.5% empleando dos aparatos para congelar; estos valores también son mayores que los que se obtuvieron en nuestro trabajo. Es importante mencionar que esta variable se ha considerado como un posible predictor de la susceptibilidad a la congelación (freezability) de los espermatozoides a la criopreservación (Petrunkina *et al.*, 2007). En relación al estado de capacitación al descongelado, Neild *et al.* (2003) reportaron un 8% de vivos no capacitados, alrededor de 12% vivos capacitados y cerca de 20% de vivos con reacción acrosomal en espermatozoides provenientes de 5 caballos. En contraste con ese trabajo, nuestros resultados fueron: 22% no capacitados, 57% capacitados y 21% con reacción acrosomal. La diferencia tan grande en los dos primeros tipos se debe, probablemente, a que nosotros no utilizamos ningún método para discriminar las células vivas de las muertas.

Respecto al efecto de la adición de progesterona sobre la inducción de la reacción acrosomal, Meyers *et al.* (1995) obtuvieron 19.7 y 5.8% de espermatozoides con reacción acrosomal en sementales fértiles y subfértiles respectivamente, empleando 3.18 μmol de P4. En contraste, Cheng *et al.* (1998) emplearon una cantidad diferente de P4 (10 mM) y observaron un 25% de espermatozoides viables con reacción acrosomal.

En nuestro trabajo, 38% de los espermatozoides fueron considerados con reacción acrosomal después de la incubación con 2 mM de P4; aunque como se mencionó anteriormente sin distinguir los vivos, en consecuencia nuestros datos

son mayores que los antes mencionados. Es posible que si empleáramos una mayor cantidad de progesterona, nuestros resultados serían diferentes; sin embargo, en nuestra experiencia 2 mM de P4 es suficiente para producir los resultados esperados.

En resumen, el largo periodo previo a la congelación (17 horas en promedio), la variación tan amplia que hay entre machos respecto a la “*freezability*” de sus espermatozoides, la estación del año en la que se recolectó el semen (fin del verano e inicio del otoño) y el número relativamente pequeño de caballos que se emplearon en este trabajo podrían explicar parcialmente nuestros resultados.

9. CONCLUSIÓN

El enfriado lento hasta -3°C , previo a la congelación, no mejoró la supervivencia de espermatozoides de caballo al descongelado. La incubación de los espermatozoides descongelados, empleando un medio apropiado para este fin (TALP), indujo la capacitación y la reacción acrosomal pero estos procesos no fueron afectados por la adición de progesterona ni por el tratamiento de enfriado.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken RJ (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7:659-668.
2. Allen WR (2005) The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 40:310-329.
3. Alvarenga MA, Leao K M, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Squires EL (2000) Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction-Stockholm Abstracts* 2:157.
4. Alvarenga MA, Leao KM, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL, Gomes GM (2003) The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Proceedings of the Workshop on Transporting Gametes and Embryos – Havemeyer Foundation Monograph series* 12:74-76.
5. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL (2005) Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 89:105-113.
6. Amann RP, Pickett BW (1987) Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7:145-173.
7. Amann RP (1999) Cryopreservation of semen. En: E Knobil and JD Neill (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press 773-783.

8. Aurich C, Seeber P, Midler-Schlosser F (2007) Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. *Reprod Domest Anim* 42:445-448.
9. Bailey JL, Buhr MM (1995) Regulation of internal Ca²⁺ by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology* 32:259-269
10. Barbas JP, Mascarenhas RD (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10:49-62.
11. Barker CAV, Gandier JCC (1957) Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci* 21:47-51.
12. Barth AD, Oko RJ (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
13. Bedford SJ, Jasko DJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW (1995) Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 43:955-967.
14. Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barriere P, Larrat M, Tainturier D (2008) The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70:1478-1488.
15. Blanchard TL, Varner DD, Schumacher JS (1998) Examination of the stallion for breeding soundness. In: *Manual of Equine Reproduction*, 3rd Edition. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (Eds.); Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, USA. 127-142.

16. Brinsko SP, Crockett EG, Squires EL (2000) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54:129-36.
17. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87:144-1474.
18. Chatterjee S, Gagnon C (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.
19. Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B (1998) Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 59:733-742.
20. Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA (2003) The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Domest Anim* 38:305-311.
21. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchoroguy TJ, Drobnis E (1989) Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26:76-84.
22. Curry MR (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod* 5:46-52.
23. Darin-Bennett A, White IG (1977) influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.

24. Devireddy RV, Swanlund D, Alghamdi AS, Duoos LA, Troedsson MH, Bischof JC, Roberts KP (2002) Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. *Reproduction* 124:643-648.
25. Devireddy RV, Swanlund D, Olin T, Vincente W, Troedsson MH, Bischof JC, Roberts KP (2002) Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod* 66:222-231.
26. Dott HM (1975) Morphology of stallion spermatozoa. *Reprod Fert* 23:41-46.
27. Douglas-Hamilton DH, Smith NG Kuster CE, Vermeiden JPW, Althouse GC (2005) Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl* 26:115-122.
28. Erwin L (2004) Lipid Bilayer Structure. En: William JL and Lane MD (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier New York 576-579
29. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT (1990) Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanism. *Cryobiology* 27:247-268.
30. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK (1995) Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10:1109-1122.
31. Garner DL, Johnson LA (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53:276-84.

32. Garzon-Perez C, Flores HF, Medrano A (2010) A simple osmotic stress test to predict boar sperm cryosurvival. *CryoLetters* 31:438-444.
33. Hafez E, Hafez B (2002) Caballos. En: Reproducción e inseminación artificial en animales, 7-edition. McGraw-hill, Interamericana México. 199-223.
34. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
35. Hansen C, Vermeiden T, Vermeiden JPW, Simmet C, Day BC, Feitsma H (2006) Comparison of FACS Count AF system, improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology* 66:2188-2194.
36. Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C (1996) Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Eq Vet J* 28:47-53.
37. Holt WV, North RD (1986) Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 78:447-457.
38. Holt WV, North RD (1991) Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 91:451-461.
39. Holt WV (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.

40. Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ; Jia YH, (2010) The cryoprotective effect of low density lipoproteins in extender on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* 117:11-17.
41. Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH (1992) Determination of the relationship between sperm motility and fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 197(3):389-394.
42. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ (1992) The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl* 29:105-16.
43. Katila T (1997) Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 46:1217-1227.
44. Katila T (2001) In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet Scand* 42:199-217.
45. Keith SL (1998) Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine Spermatozoa. Tesis Doctoral, Colorado State University Fort Collins, EEUU. 104.
46. Kenney RM; Bergman RV; Cooper WL; Morse GW (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*, 327-336.
47. Loomis PR (2001) The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci* 68:191-200.
48. Loomis PR (2006) Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin N Am (Equine)* 22:663-676.

49. Loomis PR, Graham JK (2008) Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 105:119–128.
50. Love CC, Varner DD, Thompson JA (2000) Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Reprod Fert* 56:93-100.
51. Love CC, Thompson JA, Brinsko SP, Rigby SL, Blanchard TL, Lowry VK, et al. (2003) Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60:1127-1138.
52. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R (2005) Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 20:3459-3468.
53. Martin JC, Klug E, Giinzel AR (1979) Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil Suppl* 27:47-51.
54. Maxwell WMC, Johnson LA (1997) Chlorotetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 46:408-418.
55. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE, Jr (2008) Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod* 78:2-12.
56. Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA (2002) Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58:273-276.

57. Metcalf E (2007) The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68:423-428.
58. Meyers SA, Overstreet JW, Liu IKM, Drobnis EZ (1995) Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *J Androl* 16:47-54.
59. Millete CF (1999) Spermatozoa. En: E. Knobil and JD Neill (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press 586-596.
60. Moore AI, Squires EL, Bruemmer JE, Graham JK (2006) Effects of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Equine Vet Sci* 26:215-218.
61. Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38:999-1012.
62. Morrell M, Mari G, Kutvolgyi G, Meurling S, Mislei B, Iacono E, Rodriguez-Martinez H (2011) Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E. *Reprod Domest Anim* 46(4):642-645.
63. Murphy C, English AM, Holden SA, Fair S (2014) Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 145:123–129.
64. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agiiero A (1999) Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51:721-727.

65. Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Agüero A (2000) The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 32:351-355.
66. Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A (2003) Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59:1693-1705.
67. Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M (2000) Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol* 169:3-10.
68. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38(5): 1171-1180.
69. Parks JE, Graham JK (1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.
70. Petrunkina AM, Waberski D, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E (2007) Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134:3-17.
71. Pillet E, Batellier F, Duchamp G, Furstoss V, Le Vern Y, Kerboeuf D, Vidament M, Magistrini M (2008) Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci Technol* 88:257-65.
72. Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M (2011) Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1):105-114.

73. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M (2012) Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77:268-279.
74. Pojprasath T, Lohachit C, Techakumphu M, Stout T, Tharasanit T (2011) Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology* 75:1742-1749.
75. Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA (2002) The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58:1373-1384.
76. Ríos Granillo E (2005) Comparación del enfriado tradicional a +5°C vs el enfriado a +2°C y -2°C sobre la criosupervivencia y la capacitación prematura del semen de carnero. Tesis de Maestría, FES Cuautitlán UNAM.
77. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J (1996) Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum.Reprod.Update.* 2:553-559
78. Salamon S, Maxwell WM (1995) Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 185-249.
79. Samper JC, Morris CA (1998) Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903.
80. Samper JC, Estrada AJ (2007) Evaluation of Raw Semen. En: *Current Therapy in Equine Reproduction*. Samper J, Pycock JF, McKinnon AO (Eds.); Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri. USA. 253-257.
81. Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Arav A (2007) Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reprod Dom Anim* 42:610–615.

82. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L (2007) Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* 68:745-754.
83. Sieme H, Katila T, Klug E (2004) Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61:69–784.
84. Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 107:276-292.
85. Somanath PR, Suraj K, Gandhi KK (2000) Caprine sperm acrosome reaction: promotion by progesterone and homologous zona pellucida. *Small Rum Res* 37: 279-286.
86. Spallanzani Opuscolo II L. (1776) Osservazioni e Spermienze Intorno ai Vermicelli Spermatici dell'Uomo e degli Animali. Opuscoli di Física Animale, e Vegetabile. Modena.
87. Squires EL, Keith SL, Graham JK (2004) Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62:1056-1065
88. Tischner M (1979) Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Reprod Fertil* 27:53-59.
89. Varner DD (2008) Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70:448-462.

90. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.
91. Vidament M, Duperq AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E (1997) Equine frozen semen, freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48:907-917.
92. Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M, Palmer E (2000) Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54: 907-919.
93. Vidament M, Yvon JM, Couty I, Arnaud G, Nguekam-Feugang J, Noue P, Cottron S, Le Tellier A, Noel F, Palmer E, Magistrini M (2001) Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci* 68:201-218.
94. Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P (2002) Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58:249-251.
95. Vidament M (2005) French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89:115-136.
96. Vidament M, Magistrini M, Le Folla Y, Levillaina N, Yvona JM, Duchampe G, Blesbois E (2012) Temperatures from 4 to 15°C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. *Theriogenology* 78:297–307.

97. Vlasiu T, Groza I, Morar I, Catana R (2008) The effect of different freezing procedures on sperm Head morphometry in stallions. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 65:146-151.
98. Watson PF, Martin IC (1975) The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees. Biol Sci 28:145-152.
99. Watson PF (1981) The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris GJ and Clarke A (Eds.), Effects of Low Temperature on Biological Membranes., Academic Press, London, 189-218.
100. Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev 7: 871-891.
101. Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 60-61, 481-492.