

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Comparación de dos crioprotectores en semen equino

Por:

José Antonio Guadarrama Benítez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México, Junio 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Comparación de dos crioprotectores en semen equino

Por:

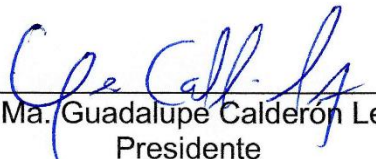
José Antonio Guadarrama Benítez

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como
requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


Aprobada por:


Dra. Ma. Guadalupe Calderon Leyva
Presidente


Dr. Edgar Díaz Rojas
Vocal externo


Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Vocal


Dr. Oscar Ángel García
Vocal Suplente


MC. José Luis Francisco Sandoval Elias
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México, Junio 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Comparación de dos crioprotectores en semen equino

Por:

José Antonio Guadarrama Benítez

TESIS

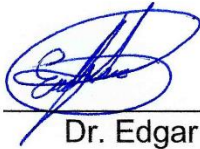
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


Aprobada por el Comité de Asesoría:



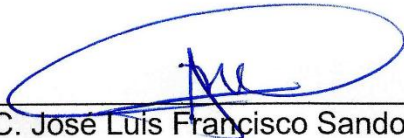
Dra. Ma. Guadalupe Calderón Leyya
Asesor Principal



Dr. Edgar Díaz Rojas
Coasesor externo



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Coasesor



MC. José Luis Francisco Sandoval Elias
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México, Junio 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios**, por poner en mi camino esta bonita profesión y permitirme llegar a esta etapa de mi vida, donde pude obtener uno de mis logros más importantes.

Agradezco a mi padre **Juan Antonio Guadarrama Enríquez** y mi madre **Ana María Benítez Ríos**, mis dos motores más grandes de mi vida que, sin el apoyo y amor de ellos, nada de esto sería posible, porque ellos creyeron en mi durante toda mi preparación académica.

Agradezco a mi hermano **Emmanuel Guadarrama Benítez**, por todo su apoyo y amor que me brinda en mi día a día, en cada uno de mis planes y actividades que realizo, él siempre se encuentra a mi lado brindándome su apoyo.

Agradezco al **Dr. Edgar Díaz Rojas**, mi maestro, mi amigo, quien me apoyo desde el primer instante en el que lo conocí, por todas sus enseñanzas que me compartió

Agradezco a un gran animal, que su ausencia en esta vida, me motivo a seguirme preparando y a enfocarme más en una especie, mi yegua de nombre la Ceniza, que me motivo a dedicarme de lleno en el mundo equino.

DEDICATORIAS

El trabajo se lo dedico a las personas más importantes en mi vida, que sin el apoyo de ellos y el impulso que me brindan en cada uno de mis proyectos nada de esto sería posible.

La dedicación es para mi padre Juan Antonio Guadarrama Enríquez y mi madre Ana María Benítez Ríos. Cada uno de mis triunfos es para ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
Lista de figuras.....	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1.1 Genitales externos	3
2.1.2 Genitales internos.....	4
2.2 Endocrinología reproductiva	6
2.2.1 Hipotálamo-hipófisis- testicular.....	7
2.3 Espermatogénesis	8
2.3.1 Fases en la espermatogénesis	8
2.3.2 Capacitación Espermática	9
2.4 Parámetros espermáticos en el semen equino	10
2.4.1 Factores que dañan la calidad seminal	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Localización y manejo de los sementales	12
3.2 Diseño experimental	12
3.3 Evaluación seminal.....	13
3.4 Análisis estadístico	14
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN.....	16
VI. CONCLUSIÓN.....	18
VII. LITERATURA CITADA	19

Lista de figuras

Figura 1. Testículo y cordón espermático derecho del caballo, descubierto.	4
Figura 2. Vagina artificial tipo Botucatu a utilizar.	12
Figura 3. Semental Custom Crome.	13
Figura 4. Semental Ampuero Wimpys Crome.	13
Figura 5. Empleo y uso de Computer Asisted Sperm Analysis System (CASA) para evaluación seminal de las pruebas a utilizar.	14
Figura 6. Concentración espermática (CONC %) y parámetros cinemáticos, espermatozoides móviles totales (MT %), motilidad progresiva (MP %), velocidad rectilínea (VSL $\mu\text{m/s}$), velocidad de trayectoria (VAP $\mu\text{m/s}$) y velocidad curvilínea (VCL $\mu\text{m/s}$) del semen equino criopreservado con dos diluyentes Butocrio y CryoMax.....	15

RESUMEN

Dada la importancia de los equinos a nivel nacional ha existido la necesidad de aplicar diferentes biotecnologías reproductivas con el fin de mejorar los parámetros reproductivos un ejemplo principal y como base en la conservación de material genético de esta especie es la congelación de espermatozoides la cual se ha investigado a través de los años con diluyentes a base de glicerol (GLY), metilformamida (MF) o dimetilformamida (DMF). En este estudio se analizaron dos sementales Cuarto de Milla, el eyaculado de cada semental se dividió en dos partes para tratamiento 1 (diluyente para congelar semen equino botucio "botupharma") y la otra mitad para el tratamiento 2 (diluyente para congelar semen equino Freezin CryoMax LE "animal reproduction systems"). Las pajillas se evaluaron pos descongelación después de un mes a una temperatura de 40°C por 20 segundos. Los resultados obtenidos en esta investigación no mostraron diferencia significativa estadísticamente ($P>0.05$) en concentración espermática y parámetros cinemáticos respectivamente. Por lo cual concluimos que es necesario incrementar la n para que nuestro experimento sea más representativo y conocer el efecto que tienen los diluyentes sobre la calidad espermática pos descongelamiento.

Palabras clave: Sementales, Congelación, Pos descongelación, Cuarto de Milla

I. INTRODUCCIÓN

Dada la importancia que tienen los caballos en todo el mundo, especialmente a nivel nacional (Díaz-Rojas et al., 2023a), surge la necesidad de preservar la genética de caballos que cumplan con los requisitos de las ganaderías ha llevado a los investigadores a buscar diferentes formas de lograr este objetivo. Actualmente, la congelación de esperma es la biotecnología más utilizada para la criopreservación de material genético. El objetivo principal de este procedimiento es reducir el daño celular que sufren las células durante la congelación y descongelación. Si estos procesos se realizan incorrectamente, a menudo resultan en daños estructurales y funcionales que reducen en gran medida su viabilidad (Lucero, 2019), deshidratación, aumento de la salinidad y manifestaciones de shock osmótico (Vera y Javiera, 2018). Estos cambios son causados por los cambios de temperatura que ocurren durante la criopreservación, que afectan los orgánulos y membranas de los espermatozoides, reduciendo su reacción acrosómica (Alvarenga et al., 2004).

A pesar de diversos avances en la mejora de esta biotecnología, se estima que solo el 50% de los espermatozoides sobreviven a la congelación y descongelación (Melo et al., 2007), lo que significa que las tasas de fertilidad se reducen significativamente como resultado de la inseminación artificial (Squires et al., 2004). Cuando se trata de congelar el material genético de los caballos mediante vapor de nitrógeno o también conocido como método tradicional o convencional, lo más habitual es congelar esperma. Sin embargo, la motilidad, viabilidad e integridad de la membrana del espermatozoide parecen disminuir durante la congelación y descongelación. Por lo tanto, esta investigación pretende ver el efecto de dos crioprotectores sobre la calidad seminal pos descongelamiento.

1.1 Hipótesis

La calidad seminal influirá dependiendo del tipo de crioprotector que se utilice.

1.2 Objetivo

Determinar el efecto de dos diferentes crioprotectores en la calidad seminal de caballos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Sistema reproductor masculino

El sistema reproductor masculino se encuentra constituido de distintos órganos en los cuales se lleva a cabo la producción de espermatozoides y de un conjunto de hormonas propias al sexo (Cuellar, 2001).

Los órganos genitales masculinos los podemos clasificar en Genitales externos y Genitales internos.

2.1.1 Genitales externos

Pene, es el órgano encargado de llevar a cabo la copulación, su estructura consiste primordialmente de tejido eréctil (Sisson y Grossman, 1992). Tiene su origen en el isquion y el cual se extiende hasta el glande, rodeando de esta manera la parte terminal de la uretra. Este también participa dentro del sistema urinario del semental (Shively, 1987).

Prepucio, se encuentra conformado por una capa doble de piel delgada, la cual se encarga de cubrir la parte libre del pene cuando este se encuentra en reposo. Actúa de manera que este se invagina sobre sí mismo en la parte craneal que da salida al pene cuando se produce una erección (Cuellar, 2001). El prepucio, se constituye de dos porciones, externa e interna, la porción externa también denominada como lamina, se extiende desde la base del escroto a una distancia de 5 a 7.5 cm del ombligo, donde esta se ve reflejada de manera dorsal y caudal para formar el borde grueso del orificio prepucial. La porción interna se encuentra de forma caudal del al orificio prepucial a una distancia de 15 a 20 cm, este cubre la parte externa del prepucio (Sisson y Grossman, 1992).

Saco testicular, forma un engrosamiento de la pared abdominal del semental. Se encuentra situado en la región anterior de los huesos púbicos, en su interior se posicionan los testículos. Su estructura se encuentra compuesta del escroto,

saco vaginal y de los músculos elevadores de los testículos (Musculo cremaster) (Lamping y Garcia, 1996).

Escroto, se encuentra compuesto de piel y una porción de la envoltura de musculo elástico, la cual se encarga de la formación de dos cavidades donde se alojarán los testículos (Lamping y Garcia, 1996). En sementales maduros se localizan en el interior del escroto los testículos y epidídimo, el cual se encarga de brindar una termorregulación en su interior para que se pueda llevar a cabo el proceso de espermatogénesis (Shively, 1987).

2.1.2 Genitales internos

Testículos, cuentan con una función específica, la cual consiste en la producción de espermatozoides y de la hormona sexual correspondiente la cual recibe el nombre de testosterona (Shively, 1987). Se encuentran situados dentro de la región prepúbica, en el interior del saco testicular también denominado como escroto (Sisson y Grossman, 1982). Son órganos que se encuentran en pares, los cuales poseen una forma alargada y ovalada, con un peso promedio de 200 a 300 gramos cada uno (Lamping y Garcia, 1996), con una medida de 10 a 12 cm de largo y de 6 a 7 cm de ancho (Sisson y Grossman, 1982).



Figura 1: Testículo y cordón espermático derecho del caballo, descubierto. a: superficie lateral del testículo, c: túnica vaginal, cortada y reflejada. D: reflexión de la túnica vaginal e: mesorquio g: cola h: cuerpo i: cabeza del epidídimo k: bolsa

testicular l: vasos testiculares a través de la túnica vaginal m: extremo de la a. testicular.

Epidídimo, según Shively (1987), es un órgano con una forma alargada el cual se encuentra unido a las gónadas (testículos) y se encarga de recibir las células sexuales inmaduras que son transportadas por medio de los conductos eferentes los cuales se unen al epidídimo y se puede llevar a cabo la maduración de estas células. En su interior se lleva a cabo la nutrición y movilidad de los espermatozoides, lo cual de esta manera se pueden conservar con vida. El epidídimo se encuentra constituido por 3 secciones, denominadas como cabeza, cuerpo y cola lo cual esta última se encuentra unida al conducto deferente (Lamping y Garcia, 1996).

La cabeza del epidídimo se conectada por medio de los conductos eferentes al testículo por medio de tejido conectivo y membranas serosas (Sisson y Grossman, 1982).

Conductos deferentes, también denominado como *vas deferens* (Sisson y Grossman, 1982). Se encarga del transporte de los espermatozoides de la cola del epidídimo a la región de la uretra. Forma parte del paquete del cordón espermático junto con los vasos y nervios testiculares (Shively, 1987).

Cordón espermático, tiene sus inicios en el anillo inguinal profundo, donde su contenido se extiende de manera oblicua y ventralmente por medio del canal inguinal, pasando por el lateral del pene para así poder terminar en el testículo (Sisson y Grossman, 1982). Constituye un grupo de estructuras las cuales se extienden desde la porción caudal del testículo por medio del conducto inguinal, dentro de su contenido se incluye estructuras como lo son el conducto deferente junto con sus vasos y arterias, nervios testiculares y también el musculo cremaster (Shively, 1987).

Próstata, la glándula prostática se encuentra presente en los diferentes mamíferos domésticos (Shively, 1987), se encarga de producir el líquido

prostático el cual ayuda a estabilizar el nivel de PH en la uretra para el paso de los espermatozoides (Cuellar,2001). La secreción producida por la próstata forma parte del eyaculado en una proporción del 25-30% (Galina y Valencia, 2008), Lamping y Garcia (1996) redactan que dicha glándula es la encargada de brindar el olor específico del semen.

Vesícula seminal, se encuentran constituidos por dos sacos piriformes alargados, que se ubican en la parte caudal de la vejiga, en el equino es de un diámetro que oscila en los 15 cm de largo con diámetro de 5 cm (Sisson y Grossman, 1982). Dichas glándulas desembocan en los conductos deferentes utilizando a los conductos eyaculadores de la uretra (Shively, 1987).

2.2 Endocrinología reproductiva

Un aspecto importante en los ritmos circadianos, es que estos se pueden sincronizar por medio de un factor ambiental como lo es la duración del día, el cual se presenta sobre un reloj interno también denominado como reloj biológico. Este se encarga de sincronizar aspectos como los ritmos hormonales en los equinos (Izquierdo, 1996).

Dentro de los parámetros fisiológicos se presenta un equilibrio que frente a cualquier alteración del medio externo se presenta lo que se denomina como una homeostasis. Los órganos sensoriales se encargan de recibir información en los cambios producidos durante un día normal y esta información se envía al cerebro el cual se encargará de controlar los ritmos y funciones de los órganos (Izquierdo, 1996).

La especie equina se caracteriza por ser fotosensibles llevándolos a ser animales estacionales, es decir de días largos (Chemineau, 1993). La producción de la hormona melatonina la cual es de origen pineal, convierte la información fotoperiódica en una señal. Una vez sintetizada la melatonina esta se libera a través del sistema vascular lo cual le permite de esta manera acceder a fluidos

y a ciertos compartimientos celulares, como lo es el semen y folículos preovulatorios (Guerrero et al., 2007).

El semental equino (potro) presenta variaciones a nivel estacional (Díaz-Rojas et al., 2023b), la cual repercute en su actividad espermatogénica presentando un aumento en el volumen de semen en los meses de abril-septiembre (Chemineau, 1993).

El semental equino (potro) presenta un incremento de los túbulos seminíferos durante la temporada reproductiva a comparación de otros meses del año. De igual manera se presenta un aumento de testosterona dentro del parénquima testicular, esto se ha demostrado ser mayor durante los meses de abril a septiembre, presentando un aumento del 65% en la producción de espermatozoides (Bustos y Torres, 2012).

2.2.1 Hipotálamo-hipófisis- testicular

Dentro del organismo se encuentra el sistema hipotálamo-hipófisis, el cual permite que pequeñas cantidades de hormonas liberadoras actúen en células pertenecientes a la hipófisis anterior, antes de incorporarse a la circulación sistémica. Dentro de estas vías neuronales solamente se incluyen neuronas excitatorias, las cuales causan excitación y activación de neuronas y algunos tejidos (García, 2018).

Las funciones reproductoras del semental comienzan con la producción y secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) la cual es segregada por medio del hipotálamo (Guyton y Hall, 2016).

La secreción de la hormona GnRH se lleva a cabo dentro del área craneal del hipotálamo, el cual se encarga de la síntesis de hormonas liberadoras (García, 2018).

La hormona GnRH se encarga de enviar el estímulo a la adenohipófisis la cual se encargará de secretar dos hormonas, las cuales consisten en la hormona

Luteinizante (LH) esta se encarga de enviar estímulos para llevar a cabo la secreción de testosterona en los testículos, la segunda hormona se trata de la hormona folículo estimulante (FSH) esta se encarga principalmente del estímulo para llevar a cabo la espermatogénesis en el semental (Guyton y Hall, 2016).

2.3 Espermatogénesis

El proceso de espermatogénesis da inicio en el epitelio germinal el cual alberga las células sexuales masculinas primarias que se encuentran en constante división, de esta manera forman nuevas células que se envergaran en la luz interior de los túbulos seminíferos, convirtiéndose en espermatozoides (Frandsen y Spurgeon, 1995).

En todo este proceso las células de Sertoli llevan a cabo la liberación de los espermatozoides en el interior de los túbulos. Durante el proceso las células de Sertoli llevan a cabo la fagocitosis del citoplasma del espermatozoide y de las células germinales las cuales se deteriorarán durante el proceso de espermatogénesis (Galina y Valencia., 2008).

Los factores endocrinos están constituidos de un grupo de hormonas que son secretadas dentro del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testicular, las cuales son las encargadas de llevar a cabo el proceso de espermatogénesis en el semental. Bajo los estímulos adecuados el hipotálamo se encarga de secretar GnRH que a su vez esta se encarga del estímulo y secreción de otras hormonas como lo son: LH, FSH y Gonadotropina (Roser, 2001).

2.3.1 Fases en la espermatogénesis

Se divide en tres distintas fases en las cuales en cada una de ellas se llevan a cabo el proceso de la espermatogénesis.

La Fase de Proliferación, consiste en llevar acabo todas las divisiones mitóticas de la espermatogonia. Distintas generaciones de A- espermatogonia son

sometidas a realizar divisiones mitóticas, las cuales se encargan de generar un gran número de B- espermatogonia, las cuales son pieza importante en la fase de proliferación de células madres. De esta manera existe una renovación constante de células las cuales permiten un nuevo desarrollo de células espermatogonias (Eelen y Kalucka, 2017).

La segunda fase que se lleva dentro del proceso de espermatogénesis es denominada como Fase Meiótica, durante este proceso se lleva a cabo la complejidad genética de esta manera garantizando la réplica de DNA durante la producción de espermias secundarios de esta manera evitando permitiendo que existan dos células espermáticas iguales (Rodriguez-Almeida et al., 2008).

Eelen y Kalucka (2017) definen a la tercera fase de espermatogénesis como el proceso de diferenciación, dicha fase es caracterizada porque una célula espermática esférica indiferenciada pasa por un proceso de modificación la cual brinda como resultado la creación de una nueva célula espermática esférica totalmente diferente, en su totalidad modificada a un espermatozoide el cual cuenta con estructuras como lo son cabeza en la cual se encuentra el material genético, un flagelo con una hélice mitocondrial.

2.3.2 Capacitación Espermática

Las células espermáticas en los mamíferos pasan por distintos cambios en su estructura y cambios bioquímicos, esto sucede cuando recorren el tracto genital de la hembra, este proceso es denominado como capacitación espermática (C.E) (Rodriguez-Almeida et al., 2008).

El proceso en el cual el espermatozoide transcurre desde el epidídimo ubicado en el testículo del semental hasta el ovocito en la hembra es denominado capacitación espermática (Salazar-Cartin, 2019).

2.4 Parámetros espermáticos en el semen equino

Se ha demostrado mediante el avance de las biotecnologías reproductivas, que solo un porcentaje que va del 30-40% de los equinos reproductores, poseen semen de calidad suficiente para ser preservado (Restrepo et al., 2016).

Dentro de los distintos parámetros que son utilizados para la evaluación de la resistencia del semen antes de ser sometido a cambios fisiológicos y ambientales, se evalúan parámetros como la viabilidad (Giraldo et al., 2006), concentración espermática, motilidad la cual nos ayuda a determinar el porcentaje de células espermáticas que cuentan con movimientos de manera lineal, morfología que ayuda a encontrar anomalía en el espermatozoide y podemos determinar esto con el uso de un examen de tinción (Muradas, 2013).

En la actualidad uno de los métodos más empleados para la obtención de medidas precisas y objetivas de motilidad espermática es mediante el uso de análisis de semen asistido por computadora (CASA), (Muradas, 2013).

2.4.1 Factores que dañan la calidad seminal

En el ámbito de reproducción equina, existen distintos factores que pueden dañar la calidad espermática y por consecuencia influir en la tasa de preñes en las yeguas inseminadas (Brinsko et al., 2000).

La célula espermática posee una gran sensibilidad a distintos factores ambientales, como lo es agua, luz solar, cambios bruscos de temperatura y también agentes externos como por ejemplo el uso de jabón y soluciones antisépticas. Es por esto que el semen se le debe de brindar un manejo cuidadoso desde su colecta hasta el momento del procedimiento ya sea la inseminación o criopreservación del mismo (Córdova-Izquierdo et al., 2006).

Un factor primordial que daña la calidad del espermatozoide es durante el procedimiento de congelación y descongelación, ya que este manejo provoca cambios en las funciones y estructuras del espermatozoide, entre los daños que

provocan este proceso se encuentran la fragmentación del ADN espermático, translocación de la fosfatidilcerina y daños en la estructura del acrosoma (Cabrera et al., 2014).

De igual manera durante la técnica de criopreservación se llevan a cabo numerosos factores que interfieren en la viabilidad del semen, por ejemplo, la cadena de enfriamiento del semen previamente diluido, la técnica de recolección y materiales empleados en el proceso, el tiempo tomado en lo que se lleva a cabo el almacenamiento y manejo del mismo, técnica de envasado, el tipo de diluyente a emplearse, etc. (Brinsko et al., 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización y manejo de los sementales

El experimento se realizó durante el mes de agosto- septiembre en la Comarca Lagunera México, localizada a una latitud 26° 23'N y una longitud de 104° 47' O. Se evaluaron dos sementales de la raza Cuarto de Milla con una edad promedio de 9 años.

3.2 Diseño experimental

Para la recolección de semen se utilizaron dos sementales a los cuales se les realizó la recolección mediante una vagina artificial tipo Botucatu, del eyaculado se dividió a la mitad uno para el tratamiento 1 (**Butocrio**, diluyente para congelar semen equino botucario “botupharma”) y la otra mitad para el tratamiento 2 (**CryoMax**, diluyente para congelar semen equino Freezin CryoMax LE “animal reproduction systems”). Después de congelar al mes se evaluó una pajilla de cada diluyente, descongelando a 40°C durante 20 segundos.



Figura 2: Vagina artificial tipo Botucatu a utilizar.



Figura 3: Semental de nombre Custom Reiner.



Figura 4: Semental Ampuero Wimpys Crome

3.3 Evaluación seminal

Los parámetros cinemáticos de los espermatozoides y la concentración espermática se determinarán con el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis System), en base la concentración espermática y a los espermatozoides

móviles totales (MT %), la motilidad progresiva (MP %), velocidad rectilínea (VSL $\mu\text{m/s}$), velocidad de trayectoria (VAP $\mu\text{m/s}$) y velocidad curvilínea (VCL $\mu\text{m/s}$).

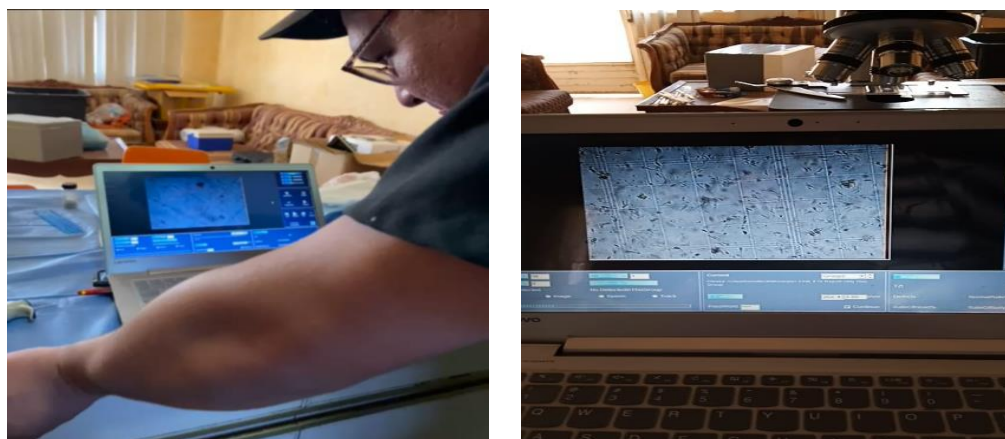


Figura 5: Empleo y uso de Computer Asisted Sperm Analysis System (CASA) para evaluación seminal de las pruebas a utilizar.

3.4 Análisis estadístico

Todas las variables fueron analizadas utilizando el programa SAS (OnDemand for Academics Dashboard). Se llevó a cabo un análisis con Tukey con valores de significancia de $P < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Los resultados en esta investigación sobre los dos tipos diferentes de criopreservación en el espermatozoide equino observamos que no existió diferencia estadística en concentración espermática ($P>0.05$) dado que de acuerdo al proceso de congelación es la adecuada para las pajillas de 0.5 ml. En el presente estudio los parámetros cinemáticos, espermatozoides móviles totales (MT %), motilidad progresiva (MP %), velocidad rectilínea (VSL $\mu\text{m/s}$), velocidad de trayectoria (VAP $\mu\text{m/s}$) y velocidad curvilínea (VCL $\mu\text{m/s}$) de los sementales no difirieron entre sí ($P>0,05$) respectivamente (figura 6).

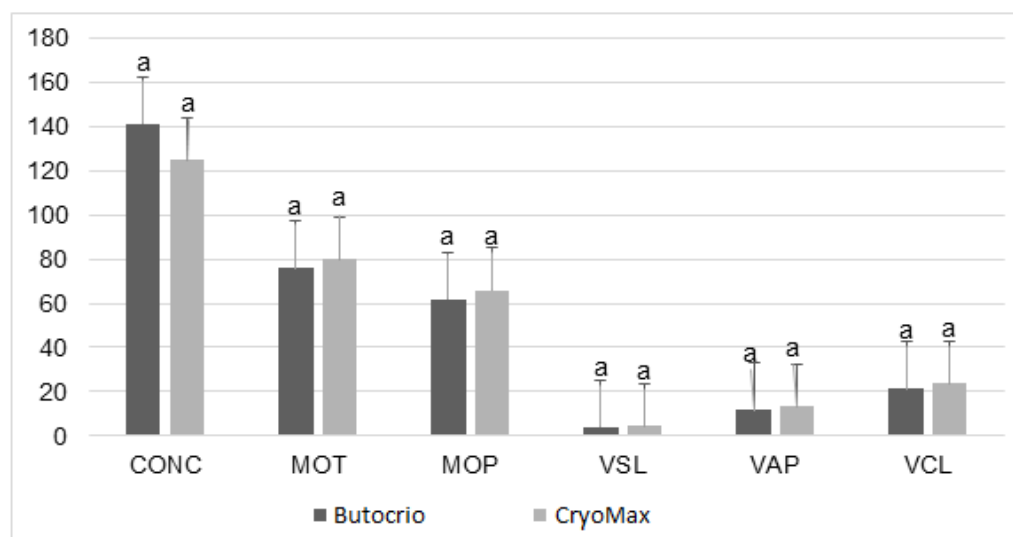


Figura 6: Concentración espermática (CONC %) y parámetros cinemáticos, espermatozoides móviles totales (MT %), motilidad progresiva (MP %), velocidad rectilínea (VSL $\mu\text{m/s}$), velocidad de trayectoria (VAP $\mu\text{m/s}$) y velocidad curvilínea (VCL $\mu\text{m/s}$) del semen equino criopreservado con dos diluyentes Butocrio y CryoMax. Superíndices iguales (a) indican que no hay diferencia estadística significativa ($P>0.05$).

V. DISCUSIÓN

Se han estudiado numerosos crioprotectores penetrantes distintos del glicerol para congelar el semen, Smith y Polge (1950), congelaron por primera vez espermatozoide equino y en 1957 se reportó el primer embarazo con semen congelado por Barker y Gandier. Estos resultados contrastan con lo reportado en un estudio que se realizó con espermatozoide de conejo en los que los parámetros cinemáticos fueron más altos con el diluyente a base de glicerol (Dalimata & Graham, 1997), y en aves (Lake & Ravie, 2000). Sin embargo, concuerda con lo reportado en un estudio que se realizó con truchas (Mcniven et al., 1993), lo que nos indica que existe una variación entre las especies.

Una posible explicación a los resultados obtenidos es el número de nuestra, sin embargo, por cuestiones de manejo y presupuesto el estudio no permitió poder analizar más muestras, Chen et al. (1996), mencionó que los espermatozoides congelados en diluyentes con sacarosa produjeron una mejor motilidad pos descongelación en comparación con los que fueron congelados con el diluyente a base de glicerol.

Los diferentes resultados se pueden deber o estar relacionados con la cantidad de sementales o por la clasificación de buenos o malos congeladores, por ejemplo, en un estudio donde solo evaluaron a sementales buenos congeladores se obtuvieron mejores parámetros cinemáticos (Vidament et al., 2002) y en otro resultado donde se utilizó mayor número de sementales existió mayor variabilidad en los parámetros cinemáticos de los espermatozoides (Medeiros et al., 2002).

En otro estudio compararon diferentes formas químicas de amidas DMF MF DMA con GLY utilizando sementales buenos y malos congeladores seis como buenos congeladores y 12 como sementales malos congeladores después de congelar el semen en un diluyente que contenía GLY se observó la capacidad de las aminas como crioprotectores ya que todas las aminas fueron estadísticamente mejor que el glicerol (Alvarenga et al., 2005).

Esto se puede deber al estrés osmótico que es inducido por la adición o la eliminación de glicerol siendo un factor importante en el proceso de protección durante el congelamiento y descongelamiento (Alvarenga et al., 2005).

VI. CONCLUSIÓN

En esta investigación podemos concluir que no existe diferencia estadística entre los dos crioprotectores analizados. Sin embargo, se ve la necesidad de incrementar el número de sementales o eyaculados para que nuestro experimento sea más representativo y conocer el efecto que tienen los diluyentes sobre la calidad espermática pos descongelamiento.

VII. LITERATURA CITADA

- Alvarenga, M. A., Leao, K. M., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L., & Gomes, G. M. (2004). The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, 12, 74-76.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
- Barker, C.A.V., Gandier, J.C.C., (1957). Pregnancy in the mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 21, 47–50.
- Brinsko, S., Varner, D. D., & Blanchard, T. L. (2000) Transporte de Semen Equino International Veterinary Information Service
- Bustos OE., Torres DL., (2012). Reproduccion Estacional en el macho. *Int, J., Morphol.* 30 (4): 1266-127
- Cabrera P., Sánchez Raúl., Risopatrón J., (2014). Selección Espermiática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmáticas, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial. *Revista Internacional de Morfología* , 32 (2), 725-731. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000200057>
- Carmeliet, P.; Eelen, G.; Kalucka, J. (2017) Arteriogenesis versus angiogenesis. In *The ESC Textbook of Vascular Biology*; Oxford University Press: Oxford,UK.
- Cheminau P. Delgadillo JA. (1993). Neuroendocrinología de la reproducción en el caprino. *Revista científica, FCV-LUZ.* 3(2): 113-121

- Chen Y, Foote RH, Brockett CC. (1996), Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30:423–31.
- Córdova-Izquierdo, A., Oaxaca, J. S., Mendoza, R. M., Córdova-Jiménez, M. S., Córdova-Jiménez, C. A., & Liera, J. E. G. (2006). Efecto del método de obtención de semen de ovino sobre la calidad espermática. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(8), 1-4.
- Dalimata AM, Graham JK. (1997). Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*;48:831–41.
- Díaz Rojas, E., Carrillo Moreno, D. I., Contreras Villarreal, V., Arellano Rodríguez, F., Alvarado Espino, A. S., & Ángel García, O. (2023a). Effect of nutraceutical supplementation on semen quality in stallions. *Veterinary Medicine and Science*, 9(6), 2600-2605.
- Díaz-Rojas, E., Carrillo-Moreno, D., Contreras-Villarreal, V., Arellano-Rodríguez, F., Alvarado-Espino, A., & Ángel-García, O. (2023b). Efecto de la estacionalidad sobre la calidad seminal de sementales Cuarto de Milla. *Abanico Veterinario*, 13, e2022-48.
- Galina C. Valencia (2008) Reproduccion de los animales domesticos. Tercera edición. Limusa.
- Giraldo, N., Villegas, J. E. C., & Araque, N. V. (2006). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(2), 8-16.
- Lake PE & Ravie O. (2000). An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci*. 25:145–50.
- Lucero, D. A. G. (2019). *Optimización de la criopreservación (refrigeración y congelación) de espermatozoides de morueco para su aplicación en*

inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) transcervical (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

- M. Lamping, T. Garcia. (1996) ANATOMÍA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS.
- McNiven MA, Gallant RK, Richardson GF, (1993), Dimethyl-acetamide as a cryoprotectant for trout spermatozoa. *Theriogenology*, 40:943–8
- Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M., Carmo, M.T., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58, 273–276.
- Melo, C. M., Zahn, F. S., Martin, I., Orlandi, C., Dell'Aqua Jr, J. A., Alvarenga, M. A., & Papa, F. O. (2007). Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 27(4), 171-175.
- Montiel Quiroga, Antonio Jersain, Hernández Pichardo, José Ernesto, Miranda Martínez, Arianna, Posadas Rodríguez, Jaqueline, & Rodríguez Suástegui, José Luis. (2022). Características seminales antes y después de la criopreservación de seis razas de equinos en latitudes cercanas al Ecuador. *Revista de Salud ñKNCXLKIHGFSAnimal*, 44, e12. Epub 01 de diciembre de 2022. Recuperado en 11 de octubre de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2022000100012&lng=es&tlng=es.
- Muradas, P. R., Weiss, R. R., & Kozicki, L. E. (2013). Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 11(3), 299-312.
- Restrepo, G, Montoya, J. D, & Rojano, B. (2016). CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CALIDAD POST-DESCONGELACIÓN DEL SEMEN EQUINO CRIOPRESERVADO CON QUERCETINA Y ERGOTIONEINA. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* , 63 (3), 167-178

- Rodríguez-Almeida, Felipe A., Ávila Cota, Carlos O., Anchondo Garay, Alfredo, Sánchez-Ramírez, Blanca, & Jiménez Castro, Jorge A.. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, 42(4), 399-406. Recuperado en 18 de mayo de 2024
- Roser., (2001) Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Animal Reproduction Science*, 68, 139-151. ISSN 0378-4320
- Salazar-Cartín, J. A. (2019). Biología de la capacitación espermática: un proceso in vivo. *Rev Col Microb Quim Clin de Costa Rica*, 25.
- Sisson S, Grossman J D, Getty R. (1982) Anatomía de los animales domésticos. 5º Edición. Barcelona Editorial Elsevier.
- Smith, AU, Polge, C., (1950), Supervivencia de espermatozoides a baja temperatura. *Naturaleza* 166, 668–669
- Squires, E. L., Keith, S. L., & Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065.
- Vera, E., & Javiera, C. (2018). Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos.
- Vidament, M., Daire, J.M., Yvon, J.M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., Ecot, P., (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58, 1–3.