

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUAR EL EFECTO CRIOPROTECTOR DE LA DIMETILFORMAMIDA EN
DIFERENTES TIEMPOS DE ADICIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN
CABALLOS CRIOLLOS COLOMBIANOS

Preparado por
DANIEL DOMINGO PEREZ QUINTERO

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:
Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá, Colombia
2014

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUAR EL EFECTO CRIOPROTECTOR DE LA DIMETILFORMAMIDA EN
DIFERENTES TIEMPOS DE ADICIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN
CABALLOS CRIOLLOS COLOMBIANOS

Preparado por
DANIEL DOMINGO PEREZ QUINTERO
Código
76121203

Director
Jair Pérez Osorio M.V., M.Sc., PhD.

Bogotá, Octubre
2014

APROBACIÓN

DIRECTOR

Jair Pérez Osorio

JURADO

Harvey Lozano Márquez

JURADO

Fernando Escobar

JURADO

Gloria Marcela Mayor

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo

Vicerrector Académico Hno. Carlos Enrique Carvajal

Vicerrector De Investigación
Y Transferencia Hno. Manuel Ramírez Jiménez

Vicerrector De Promoción Y
Desarrollo Humano Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero

Vicerrector Administrativo Dr. Eduardo Ángel Reyes

Decano Facultad de Ciencias
Agropecuarias Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto

Secretario Académico Dr. Alejandro Tobón González

Director De Posgrados Dr. Ernesto A. Dalmau

COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente por el apoyo de mi familia, el cual siempre ha sido incondicional tanto en la parte académica como personal, permitiendo cumplir con una meta, de muchas más.

A la universidad por su constante búsqueda de la excelencia académica y de su importante participación en la formación de personas en el sector agropecuario.

A los jurados por su tiempo y dedicación buscando mejorar cada vez más este trabajo de investigación, lo cual es un reflejo del apoyo y participación de mi formación académica.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Jair Pérez O, por su paciencia, disposición e infinita generosidad al acompañarme en cada momento de la maestría y de este trabajo.

A los compañeros de estudio que de una u otra manera aportaron para que este proceso se culminara y lograr objetivos tanto en las clases como en el trabajo de investigación.

RESUMEN

En el presente estudio se determinó cual protocolo propuestos presentan mejores resultados en el proceso de congelación y descongelación de las células espermáticas. T1 adición de dimetilformamida al 5% en una única etapa y T2 adición fraccionada de dimetilformamida al 5% en un periodo de 10 minutos. Fueron seleccionados cinco eyaculados de caballos criollos colombianos, la muestra fue diluida en una proporción 1:1 en un diluyente comercial Kenney®, posterior a esto se centrifugo y se retiró el sobrenadante. Se diluyo la muestra con INRA 82 modificando ajustando la concentración final a 100×10^6 millones de espermatozoides por pajilla de 0,5 ml. Se analizaron variables como la motilidad total, motilidad progresiva, integridad de la membrana plasmática (prueba de HOST) en diferentes etapas del proceso y se realizó un análisis computarizado del semen pos-descongelación. Fue empleado un diseño de bloques completos al azar, donde cada bloque fue la unidad experimental y las medias comparadas a través del test de Tukey (distribución normal). Para las variables que no presentaron una distribución normal, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar las medianas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la motilidad total, en los procesos de dilución inicial, congelación, y postdescongelación entre los tratamientos evaluados. El uso de la DMF al 5% asociado con INRA 82 en estado de refrigeración y congelación demostró ser un protocolo eficiente para la criopreservación espermática del Caballo Criollo Colombiano

Palabras clave: caballo criollo, criopreservación, dimetilformamida.

ABSTRACT

The following study determined which protocol proposed presented better results in sperm cryopreservation, of the Colombian horse; T1 addition of dimethyl-formamide at a concentration of 5% in an only addition rate and T2 addition of dimethyl-formamide in a fractional period of 10 minutes.

Five stallions of the Colombian breed where chosen; the sperm was diluted in a 1:1 proportion with Kenney® a commercial extender. The sperm was centrifuged, and re-diluted with INRA 82, adjusting the concentration at 100×10^6 million spermatozoa per ml in a 0,5 ml straw.

The sperm variables taken into account where total motility, progressive motility, integrity of the sperm membrane (HOST test) in different steps of the cryopreservation, finally a computerized analysis of the sperm after the freezing process was done.

The statistical analysis was done by the Krukall Wallis and ANOVA randomized blocks, each block was considered to be the experimental unit and the means where compared by the Tukey test.

There were significantly statistical differences between the total motility, being less after the dilution, freezing process and posthaw, overall and in between treatments. There is also a statistical difference in the morphology of the analyzed sperm, before and after freezing process.

Key word: Colombian horse, cryopreservation, dimethyl-formamide

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. OBJETIVO	16
1.2. HIPOTESIS	16
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. Criopreservación	17
2.1.1. Principio de la criobiología.....	17
2.1.2. Eventos que ocurren durante la criopreservación y descongelación a nivel celular	18
2.1.3. Efecto de velocidad de congelación sobre la célula espermática.....	19
2.1.4. Shock térmico	19
2.1.5. Estrés osmótico	20
2.1.6. Estrés oxidativo y apoptosis	22
2.2. Diluyente INRA 82.....	23
2.2.1. Composición del INRA 82.....	24
2.3. Congelación	25
2.3.1. Técnicas de congelación de semen equino	25
2.4. Crioprotectores.....	28
2.4.1. Dimetilformamida.....	29
2.4.2 Dosis en los diluyentes	29
2.4.3 Mecanismo de acción como crioprotector	30
2.4.4 Efectos adversos de la dimetilformamida	30
2.5. Evaluación del semen equino	30
2.5.1. Aspecto.....	32
2.5.2. pH	33
2.5.3. Motilidad total.....	33
2.5.4. Concentración.....	34
2.5.5. Morfología.....	34

2.5.6. Centrifugación seminal	35
2.5.7. Sistema computarizado de análisis seminal	35
2.5.8. Evaluación de la membrana plasmática	37
2.5.9. Test hiposmótico.....	38
2.6. Características seminales del caballo criollo colombiano.....	38
2.6.1 Evaluación del eyaculado del caballo criollo colombiano.....	38
2.6.2 Efecto de la congelación sobre parámetros espermáticos en el caballo criollo colombiano	39
3. METODOLOGÍA.....	40
3.1. Ubicación geográfica.....	40
3.2. Criterios de selección de la unidad experimental	40
3.3. Métodos y procedimiento	40
3.3.1. Obtención y evaluación del semen pre-congelación.....	40
3.3.2. Concentración y ajuste de volumen	41
3.3.3. Congelación.....	41
3.3.4. Curva de descongelación	42
3.3.5. Evaluación espermática pos-descongelación	42
3.4. Diseño Estadístico	42
4. RESULTADOS	43
4.1. Caracterización del semen fresco de los Caballos Criollos Colombianos.....	43
4.2 Efecto de las diluciones con y sin crioprotector inmediato y fraccionado sobre parámetros seminales.....	43
4.2.1 Motilidad total y progresiva	43
5. DISCUSIÓN	47
6. CONCLUSIONES	50
7. LISTA DE REFERENCIAS	52

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	Protocolos de congelación de semen equino	19
TABLA 2	Características de cinco eyaculados de Caballos Criollos Colombianos	45
TABLA 3	Efectos de la dilución, crioprotector y la congelación sobre Parámetros espermáticos	48
TABLA 4	Parámetros seminales post-descongelación	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Efecto de las diluciones y la criopreservación sobre la motilidad espermática total y progresiva

47

LISTA DE SIGLAS

Sigla	Inglés	Español
AI	Artificial insemination	Inseminación Artificial
mL	Mililiters	Mililitros
UI	Internationals Unites	Unidades Internacionales

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo han sido introducidas a la industria equina numerosas tecnologías reproductivas, entre ellas, la criopreservación de espermatozoides, que ha resultado ser particularmente importante, puesto que facilita el comercio nacional e internacional de semen equino, en especial de aquellos reproductores equinos de gran importancia, permitiendo su conservación a largo plazo. No obstante este proceso de conservación del semen ayuda a el control de la diseminación de enfermedades venéreas y permitiendo a su vez, la inseminación de varias yeguas con un solo eyaculado (Peña *et al.*, 2011).

A pesar de los beneficios destacados a este procedimiento, la calidad del semen post descongelación, es inferior a la del semen fresco. Ya que ello se ha demostrado mediante la disminución de la tasa de preñez cuando se insemina con semen congelado, comparando ello con la uso del semen fresco o refrigerado (Hoffmann, Oldenhof, Morandini, Rohn, & Sieme, 2011). Lo anterior sucede por los cambios que sufre la célula espermática durante el proceso, los cuales llevan a la pérdida de integridad y de la función de la membrana plasmática (Parks & Graham, 1992).

De cierta manera, cuando el descenso de la temperatura se da en un intervalo corto de tiempo, la célula espermática sufre cambios irreversibles los cuales están relacionados directamente con shock térmico, estrés osmótico, estrés oxidativo, formación de cristales de hielo y apoptosis. Por tal motivo, es importante tener presentes los tiempos de congelación, los crio-protectores utilizados, los diluyentes empleados, las interacciones del proceso, además de los métodos de empaquetamiento y de almacenamiento (Peña *et al.*, 2011).

En términos generales, la fertilidad con semen congelado en equinos es menor comparándola con otras especies. Este fenómeno se debe principalmente a factores propios del equino y también a la selección del reproductor a congelar; se suele seleccionar el equino de acuerdo a su rendimiento en cada una de las disciplinas ecuestres, más no por su capacidad reproductiva como tal (Clulow, Maxwell, Evans, & Morris, 2007).

Normalmente los sementales se clasifican como "buenos" o "malos" con respecto a la congelación de su semen, se basa en las características motiles post-descongelación, incluyendo los porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva y la tasa de velocidad. Se ha demostrado que aproximadamente el 20% de los sementales muestran buena congelabilidad con más de 40% de motilidad progresiva de los espermatozoides después de la congelación-descongelación, el 60% tiene congelabilidad aceptable o razonable con un 20 - 40% de motilidad progresiva post-descongelación, y el 20% muestran una mala congelabilidad con

menos del 20% de motilidad progresiva de las células después de la congelación-descongelación (Hoffmann, et al., 2011).

1.1. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto crioprotector de la dimetilformamida a una concentración constante (5%) en dos velocidades de adición en la criopreservación de semen de caballos criollos colombianos, utilizando INRA 82 modificado como diluyente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar los cambios espermáticos antes y después de ser sometido a un proceso de criopreservación mediante un microscopio de fase, teniendo en cuenta los cambios en el proceso al utilizar dos tiempos de adición del crioprotector.

Determinar la viabilidad de la membrana plasmática de la cola del espermatozoide empleando el test hiposmótico (HOST), realizando dicha prueba antes y después de la criopreservación, teniendo siempre presente los cambios en los espermatozoides en los dos grupos de tiempos de adición del crioprotector.

Determinar la morfología espermática comparando tinciones vitales (verde malaquita, rojo congó y azul de metileno) en diferentes momentos del proceso de criopreservación; antes de la centrifugación, después de la misma, en el momento de la adición del crioprotector y posterior a la descongelación del semen.

Determinar la viabilidad de los parámetros espermática (motilidad total, motilidad progresiva y vigor) mediante el test de termorresistencia, teniendo en cuenta los dos grupos de estudio posterior a la descongelación. De esta manera se determina cuál de los dos grupos presenta mejores condiciones de viabilidad espermática.

1.2. HIPOTESIS

HIPÓTESIS: Con la utilización de la dimetilformamida al 5% como crioprotector y con una adición lenta (10 minutos) se obtiene mejor viabilidad espermática en el proceso pos descongelación, al compararlo con la adición única del mismo crioprotector.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Criopreservación

La criopreservación es el proceso en el cual células, tejidos e inclusive individuos son congelados a bajas temperaturas (entre 80 °C y -196 °C). Se busca disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo para que de esta manera se pueda mantener en condiciones de vida suspendida por largos periodos de tiempo. Esto se logra ya que a dichas temperaturas las actividades biológicas de las células son suspendidas; inclusive las reacciones bioquímicas que producen la muerte celular (Shaw & Jones, 2003).

2.1.1. Principio de la criobiología

El objetivo principal de la Criobiología, es la conservación de células vivas mediante la implementación de bajas temperaturas, frenando de esta manera los procesos de envejecimiento y degeneración celular. Esta disciplina aplicada a técnicas de reproducción asistida, proporciona la metodología más idónea para mantener la diversidad genética. La criopreservación de material biológico se da generalmente en un medio acuoso, el cual tiene una serie de solutos presentes (Vila, 1984).

Por otra parte, es importante mencionar que el punto de congelación de la solución es inverso a la concentración de solutos. Por tal motivo cuando una suspensión celular es refrigerada (entre -5°C y -10° C) se forman núcleos de hielo, los cuales se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular (Vila, 1984).

El hielo en el espacio extra-celular es capaz de coexistir con el líquido intra-celular, gracias a la membrana plasmática, la cual constituye una barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula (Vila y Gracia, 1983). Cuando el medio extracelular sufre la mencionada cristalización, existe formación de los cristales de hielo de tal manera que quedan los solutos más concentrados en la fracción líquida. En consecuencia, la célula en suspensión debe deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico, ya que el medio extracelular es cada vez más hipertónico (Boiso, 2001).

Hay una extracción de calor que genera el descenso de la temperatura hasta alcanzar el punto eutéctico, el cual se entiende como la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del soluto. En consecuencia, se entiende que cuando se alcanza este punto, se presenta la máxima concentración del soluto antes de que tanto éste como el líquido se solidifiquen (Boiso, 2001).

El paso siguiente es denominado sobre-enfriamiento. Este es un estado estable de la suspensión celular que al haber sido enfriada lentamente, alcanza temperaturas por debajo de su punto de cristalización manteniendo el semen un estado líquido. Por tal motivo el líquido intracelular fluye hacia el espacio extracelular, gracias a la diferencia de potencial entre el medio intra y extra celular (Boiso, 2001)

Debido a los cambios de temperatura y por el proceso de cristalización, se presenta una liberación de energía que puede traducirse en pérdida de calor. Este evento incrementa transitoriamente la temperatura de la célula, la cual desciende rápidamente debido a que el proceso de enfriamiento continúa. Estos cambios de temperatura se dan en un intervalo de tiempo muy corto, por lo que produce cambios perjudiciales para la célula (Boiso, 2001).

2.1.2. Eventos que ocurren durante la criopreservación y descongelación a nivel celular

Existe una serie de eventos que suceden e interactúan entre sí en el proceso de criopreservación celular. Como se ha mencionado anteriormente, estos eventos terminan casi siempre con el deterioro e incluso la muerte de la célula espermática. Tales eventos incluyen el shock térmico, el estrés osmótico, la formación de cristales de hielo, el estrés oxidativo y la apoptosis. Esta serie de procesos serán descritos con mayor detalle más adelante (Boiso, 2001).

Durante la criopreservación de semen, la desestabilización de la membrana del espermatozoide ocurre cuando dicha membrana es sometida a un proceso de transición desde una fase fluida a una fase de gel, a medida que la temperatura disminuye. Dicha desestabilización está caracterizada por una pérdida rápida de fosfolípidos y un reordenamiento de estos últimos y de las proteínas dentro de la membrana espermática. Esto permite que la membrana se torne permeable al agua y a diversos iones, haciendo que el espermatozoide exhiba una motilidad anormal (motilidad circular y defectos en la pieza media) y mueran de forma prematura (Loomis & Graham, 2008).

Con el fin de maximizar la supervivencia de los espermatozoides, los protocolos de congelación están diseñados para minimizar estas injurias a través de la adición de crioprotectores y el uso de tasas de congelación y descongelación adecuadas. Sin embargo, estudios han demostrado que no hay formación de cristales de hielo intracelular con las tasas de congelación actualmente en uso. Por ende, la principal fuente de daño celular, proviene del estrés osmótico, especialmente durante la descongelación (Peña, *et al.* 2011).

2.1.3. Efecto de velocidad de congelación sobre la célula espermática

Actualmente se ha planteado la hipótesis sobre la deterioración criogénica de los espermatozoides de la siguiente forma: si las células se enfrían a tasas rápidas hay daño celular por la formación de hielo intracelular, y si se enfrían a tasas muy lentas puede haber daño celular por una larga exposición a las soluciones concentradas resultantes de la conversión progresiva de agua en hielo (Macías García et al., 2012)

Debido a la gran variedad de tipos celulares, existen velocidades óptimas específicas de enfriamiento que buscan asegurar que el proceso se lleve a cabo de la mejor manera y por ende, la viabilidad de la célula se mantenga. Para que las células espermáticas continúen siendo viables, se deben manejar enfriamientos a una velocidad entre 10-100°C/min., ya que velocidades mayores o menores afectarán de manera directa la supervivencia de las mismas (Muiño, Tamargo, Hidalgo y Peña 2009).

2.1.4. Shock térmico

Cuando los espermatozoides son expuestos a un medio adecuado no sufren daños con el cambio de temperatura inicial de 37°C a 20°C. Cuando se busca disminuir la temperatura a niveles de 20°C a 5°C, se presenta una situación de estrés para el espermatozoide y es en ese momento, cuando se presentan una serie de daños que pueden llegar a entorpecer los resultados de la congelación (Morel, 2005).

El descenso de la temperatura tiene implicaciones que afectan directamente a la membrana plasmática, ya que se presenta un cambio de una fase líquida a un estado de gel. De igual manera, este autor sostiene que para disminuir los efectos nocivos, es necesario un control estricto de la tasa de descenso de la temperatura entre los 19°C y los 8°C (J. K. Graham, 1996). Por otro lado reportó la necesidad de modificar los medios extensores; adicionando lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Crulow et al, 2007).

Tasas rápidas o lentas del descenso de la temperatura, pueden llevar a la presentación de shock térmico por parte de los espermatozoides, lo que permite establecer que si se lleva a cabo una refrigeración rápida hasta los 5°C, se induce la generación contundente de daños irreversibles, evidenciados por movimientos circulares anormales, pérdida rápida de la motilidad, alteraciones en la membrana plasmática, reducción del metabolismo y pérdida de componentes intracelulares. Los cambios del shock térmico se dan principalmente por una re-organización de los

fosfolípidos, debido principalmente a un cambio en la membrana plasmática como tal, lo cual afecta su funcionamiento normal (Watson, 2000).

Como la membrana plasmática recubre una variedad de estructuras, éstas también resultan afectadas y de manera especial las mitocondrias, las cuales frecuentemente sufren daños al ser sometidas a shock térmico (L. Graham, Bando, Gray, & Buhr, 2004), lo que lleva a pensar en una posible alteración del metabolismo del espermatozoide.

Watson (2000) afirma que cuando la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados y fosfolípidos es mayor, se produce un descenso de colesterol que deja a la célula espermática más vulnerable al shock térmico, puesto que la membrana espermática se torna menos estable y compacta.

Debido a la modificación que sufre la membrana a causa del shock térmico, se produce una alteración en su función como barrera física en razón de la cual la entrada de cationes es mayor, generando un movimiento de iones que modifica las concentraciones iónicas de los medios intracelulares y extracelulares (Ball, 2008).

De manera tal que las concentraciones de iones Na^+ y Ca^{++} sufren cambios drásticos; a temperaturas de 5°C , la membrana celular se vuelve significativamente más permeable al Ca^{++} . Debido a esto los niveles de dicho ion se incrementan considerablemente en el espacio intracelular llegando a niveles tóxicos; ya que los niveles de Ca^{++} superan la capacidad de eliminación de las bombas de Ca^{++} . La evidencia de dichos cambios se expresa en una disminución de la motilidad espermática y un cambio morfológico en el acrosoma; resultando comprometida la capacidad fecundante del espermatozoide (Palma, 2001).

2.1.5. Estrés osmótico

La capacidad de la célula espermática para responder a los ajustes del volumen, está determinada por varios factores que deben ser tenidos en cuenta para entender este acontecimiento. Entre estos factores se encuentra la composición de la membrana plasmática (fosfolípidos principalmente), la permeabilidad al agua, la temperatura, la actividad de la bomba ATPasa, las cantidades de agua y las cantidades iónicas (Watson, 2000).

Se debe considerar que la congelación del líquido extracelular conlleva a un incremento en la presión osmótica. Estos cambios producen estrés a la célula espermática, por lo que genera una respuesta inmediata por parte de la misma. A una temperatura de 5°C el líquido intracelular permanece refrigerado pero no se cristaliza,

de tal manera que la formación de los llamados cristales de hielo en el medio extracelular ocurre a una temperatura promedio de -7.5°C (Watson, 2000).

Una vez ocurre la cristalización del líquido presente en el medio extensor, la presión osmótica del medio extracelular se incrementa considerablemente. Debido a este cambio y como primera respuesta, ocurre la salida de líquido del espacio intracelular al espacio extracelular. A causa del gradiente de presión osmótica tiene lugar el intercambio de fluidos del interior de la célula espermática al medio extracelular y solo se detiene cuando hay una concentración de solutos considerable en el espacio intracelular, de manera que se lleva a la célula a un estado que previene futuros cambios tales como la formación de cristales de hielo (Watson, 2000).

Dado lo anterior se considera la importancia de una curva de congelación, pues si ésta es muy lenta, puede conllevar a una deshidratación de la célula, ya que por la presión osmótica, el fluido intracelular tiende a migrar al espacio extracelular, lo cual acarrea cambios perjudiciales para la célula. Esta deshidratación excesiva de la célula espermática puede llevar al colapso de la membrana plasmática (Medeiros, *et al.* 2002).

Todos estos cambios en la osmolaridad inducen a cambios en el volumen del espermatozoide. Basados en mediciones electrónicas del volumen celular, han encontrado que cuando se expone a la célula espermática a osmolaridades de hasta 900 mOsm / kg, los espermatozoides pueden recuperar su volumen inicial, sin daños importantes cuando se regrese a las condiciones isosmolares. Sin embargo, cuando se exponen a 1500 mOsm / kg, los espermatozoides pierden la capacidad de recuperar su volumen inicial. Este rango puede representar un "límite de tolerancia osmótico" para los espermatozoides, que una vez sobrepasado, conduce a daños irreversibles. No obstante, también se ha demostrado que la exposición de los espermatozoides a bajas osmolaridades también puede conducir al daño de los mismos. Esto es evidenciado debido a la incapacidad del espermatozoide para recuperar la motilidad inicial después de una exposición a osmolaridades por debajo de 450 mOsm/kg (Peña *et al.*, 2011)

Existe un grupo de proteínas que cumplen una función importante, ya que se encargan de la señalización celular, especialmente a los estímulos generados por el estrés osmótico. Estas proteínas son denominadas proteínas mitogénicas activadas o MAP, las cuales son un grupo de kinasas que cumplen un papel muy importante en la traducción de señales a nivel de superficie celular. Volonte y colaboradores, afirman que las MAP son indispensables en la proliferación y diferenciación celular, las cuales son activadas por diferentes estímulos como respuesta al estrés celular. Específicamente se pueden identificar algunas kinasas como la ERK 40; encargadas de la regulación de las señales osmóticas extracelulares y otro grupo como la de p38

kinasa; que se activan por estímulos de estrés, incluyendo el osmótico. Debido a la activación de las mencionadas kinasas se activa el caveolin – 1 el cual induce una cascada de eventos los cuales conllevan a estrés celular y generan pérdida de la funcionalidad a nivel de la membrana celular. (Volonté, Galbiati, Pestell, & Lisanti, 2001).

2.1.6. Estrés oxidativo y apoptosis

El estrés oxidativo está determinado por el balance entre la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS - Reactives Species Oxigen) y la degradación de las mismas dentro de los tejidos. Las dos principales fuentes de generación de ROS en el tracto reproductivo del macho equino, provienen de los espermatozoides inmaduros, inmóviles y/o morfológicamente anormales, de los leucocitos infiltrados en el semen y de los espermatozoides morfológicamente normales pero funcionalmente anormales. Uno de los efectos de los ROS es la alteración de la membrana celular por el proceso denominado peroxidación lipídica (PL), proceso fisiopatológico que tiene como resultado una cascada de profundos cambios degenerativos que afectan la organización y función de la membrana del espermatozoide (Arata-Bellabarba, Osuna, Gómez, & Regadera, 2005).

La peroxidación lipídica (PL) de la membrana plasmática se ha propuesto como un factor importante en el deterioro criogénico de los espermatozoides en muchas especies, incluyendo los caballos. Dos mecanismos independientes son los responsables de la generación de ROS en los espermatozoides de los mamíferos (Arata-Bellabarba, Osuna, Gómez, & Regadera, 2005).

El primero consiste en un sistema enzimático situado en la membrana que utiliza NADPH como sustrato, y el segundo implica la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La principal fuente de estrés oxidativo de los espermatozoides son las mitocondrias. Como los electrones pasan de los complejos I a IV en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, la continua fuga de electrones conduce a la formación de anión superóxido $O_2^{\bullet-}$. Se estima que aproximadamente el 2% del oxígeno consumido se convierte en $O_2^{\bullet-}$ por esta vía. La dismutación espontánea o la superóxido dismutasa (SOD) convierte entonces $O_2^{\bullet-}$ a peróxido de hidrógeno H_2O_2 en la matriz mitocondrial. Si H_2O_2 no es descompuesto en agua por la glutatión peroxidasa o catalasa, este es transformado por la reacción de Fenton (en la presencia de cationes divalentes tales como Fe^{2+}) al más perjudicial de todos los radicales libres llamado radical hidroxilo HO^{\bullet} (Peña, et al., 2011). El espermatozoide equino es particularmente susceptible al estrés oxidativo, en comparación con otras especies, debido a que contiene grandes cantidades de ácidos grasos insaturados. Adicionalmente al efecto

negativo sobre la membrana celular, las especies reactivas del oxígeno y la criopreservación promueven una fragmentación del ADN celular y un agotamiento del ATP mitocondrial (Baumber, Ball, Linfor, & Meyers, 2003). Los espermatozoides equinos producen especies reactivas del oxígeno en su actividad metabólica normal, pero el balance entre la generación y la captura de estas determina el efecto deletéreo sobre las células espermáticas (Almeida & Ball, 2005). Altas concentraciones de estas especies causan daño en un sinnúmero de moléculas biológicas como carbohidratos, proteínas, lípidos de membranas y ADN. Por otro lado, las bajas concentraciones causan pérdida reversible de la motilidad espermática (Baumber, et al., 2003).

Con la congelación y descongelación aumenta la producción de ROS en las mitocondrias del esperma, mientras que un mecanismo osmótico puede aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, generando la activación de la apoptosis; de hecho, el estrés oxidativo es un buen inductor de la apoptosis. Un aumento de ROS puede inducir un aumento del Ca^{2+} intracelular que a su vez activa la caspasa 3. Recientes datos experimentales apoyan esta teoría, ya que activa a las proteínas implicadas en la activación de la apoptosis tales como caspasas 3 y 7 las cuales, así mismo, se ven implicadas en la activación de la caspasa 9 responsable de la apoptosis por vía mitocondrial. Esto ha sido descrito tanto en semen equino fresco como congelado (Peña, *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, además de la contracción celular, el estrés osmótico también puede inducir daño oxidativo y la apoptosis de los espermatozoides.

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada en los organismos multicelulares. Este mecanismo es accionado por dos vías: intrínseca y extrínseca. La ruta extrínseca es activada por el factor de necrosis tumoral (TNF), el cual desencadena una serie compleja de procesos. Por el contrario, la vía intrínseca se activa en células en las que se altera la homeostasis como resultado de la tensión inducida por una amplia variedad de factores, incluyendo el estrés oxidativo, el calor, la hipoxia, el daño del ADN, etc. Esta vía es regulada por la interacción de los miembros pro y antiapoptóticos de los linfocitos B y al igual que la vía extrínseca, después de una serie de complejos procesos, termina en la apoptosis o muerte celular programada (Peña, *et al.*, 2011).

2.2. Diluyente INRA 82

Existen una gran variedad de diluyentes para el semen, básicamente son medios enriquecidos con diferentes sustancias la cuales proporcionan un ambiente adecuado

para que los espermatozoides logren sobrevivir por un periodo mayor de tiempo (Squires, 1999).

Las razones por la cuales se debe utilizar un diluyente en programas de biotecnología de la reproducción son varias, deben tener un componente antibiótico para controlar de manera efectiva agentes patógenos y así limitar los efectos nocivos que puedan causar a la célula espermática. Deben prolongar la sobrevivencia de los espermatozoides por diferentes acciones; protegiendo a los espermatozoides de condiciones ambientales desfavorables, provee de nutrientes esenciales para los espermatozoides, ajusta una presión osmótica compatible con el espermatozoide (300 a 400 mOsmoles). Por otro lado el diluyente debe tener la capacidad de proteger la célula espermática de productos tóxicos secundarios al metabolismo espermático, brindar una protección efectiva frente a los cambios de temperatura y finalmente estabilizar los sistemas enzimáticos y la integridad de las membranas del espermatozoide (Olivieri et al., 2011).

Los componentes presentes en los diluyentes utilizados para la preservación de semen son sustancias iónicas, tampones, agua, macromoléculas, carbohidratos, antibióticos y crioprotectores (Maxwell & Salamon, 1993).

El diluyente INRA 82 es utilizado con frecuencia en la refrigeración del semen equino, este diluyente ha mostrado mejores resultados que otros a la hora de proteger la célula espermática de dicha especie (Ijaz & Ducharme, 1995). Estos autores reportan que el semen equino diluido en este medio y refrigerado a 5°C durante 96 horas logro mantener niveles de motilidad hasta de un 56 %, además reportan que al adicionar de yema de huevo al 2%, logro mantener una mejor motilidad que otros diluyentes y reporto un mayor porcentaje de preñez (80,6%) comparado con 56.6%.de otros diluyentes (Rota, Furzi, Panzani, & Camillo, 2004).

Este diluyente puede ser utilizado para semen fresco o criopreservado, de manera que para poder congelar semen con este diluyente se debe adicionar como mínimo un crioprotector, para resultados satisfactorios en la descongelación y posible fertilización en la inseminación artificial. (Wrench., 2007).

2.2.1. Composición del INRA 82

Como se expuso anteriormente cada diluyente tiene una composición diferente por lo que se debe tener presente cada uno de sus componentes al igual que las cantidades del mismo para así poder entender a fondo la función de cada uno de los elementos presentes en este diluyente.

- Glucosa (5 g)
- Lactosa (300 g)
- Rafinosa (300 g)

Fuente	Dilución	Extensor centrif.	Centrifugación	Diluyente	Glicerol %	Empaquete	Congelación	Descongelación
Tischer (1979)	Colecta de fracción en esperma			Lactosa-EDTA-EY	3.5	Tubos de aluminio (20-25 ml)	7-9 min, 40 ° C, 50 s vapor N2	
He (1986)	1:1	11% sucrosa	350-450 g, 12 min	Sucrosa-leche-EY	4-5	Viales de vidrio (1 ml)	N2 vapor 20 min, N2 vapor	Sucrosa-leche 50 ° C, 40 s
Martin et al. (1979)	1:1	Glucos-EDTA	1000 g, 10 min	Merck - lactosa-EY	5	Macrotü b® (pajilla 4.0ml)		
Loomis et al. (1983)	1:1	Glucos-EDTA	650 g, 15 min	EDTA-lactosa-EY	5	Pajillas 0.5ml	10 min, 38 ° C, 30 s N2 vapor	
Cochran et al. (1984)	50 x 10 ⁶ sp./ml	Citrato-EDTA)20°C amortiguado	400 g, 15 min	Lactosa-EDTA-EY	5		-15 °C: 10 ° C/min; -15→-12 °C: 25 ° C/min +4 → -140 °C: 60 ° C/min +20 → -10 °C: 10 ° C/min; -10→-14 °C: 25 ° C/min →+4 ° C: 30s	37 ° C, 30 s o 75 ° C
Palmer (1984)	1:4	INRA-82-EY →+4°C/1 h	600 g, 10 min	INRA-82-EY	2.5		-140 °C: 60 ° C/min +20 → -10 °C: 10 ° C/min; -10→-14 °C: 25 ° C/min →+4 ° C: 30s	37°C, 30s
Hard and Hard (1991)	50-80 x 10 ⁶ sp./ml	Citrato-EDTA (30 ° C), amortiguado	400 g, 15 min	Lactosa-EDTA	5		-10→-14 °C: 25 ° C/min →+4 ° C: 30s	75°C, 7s luego 35°C, 10-15 h

Fuente	Dilución	Extensor centrif.	Centrifugación	Diluyente	Glicerol %	Empaque	Congelación	Descongelación
Vidament (2005)	2.5 x 10 ⁹ sp./50 ml tube	UHT leche descremada (37 °C)	600 g, 10 min	INRA-82-EY	2.5		min; +4 → -140 °C; 30 s	37 °C, 40–60 °C/min

Otros aspectos importantes a tener en cuenta es el reposo sexual prolongado, las características individuales de los sementales y las condiciones de higiene que preceden a la congelación. El reposo sexual prolongado puede dar lugar a espermatozoides de menor calidad, por esto se recomienda para la preparación de esperma congelado realizar un intervalo de colectas al menos 48 horas antes, aunque esto debe adaptarse a cada individuo (Sieme, et al., 2008).

Los protocolos actuales de congelación de semen equino constan básicamente de dos etapas en las que el semen se diluye primero con un diluyente se centrifuga y luego se diluye una segunda vez, antes de la congelación en un diluyente que contiene un agente crioprotector. La primera dilución puede emplear solución salina, azúcar, diluyente de leche descremada utilizados para diluir el semen fresco. La tasa de dilución es 1:1 o se diluye el semen a una concentración de aproximadamente 50 millones de espermatozoides / ml. Incluso Clulow *et al.*, en 2008, demostraron que a concentraciones tan bajas como 40 x 10⁶ /ml en pajillas de 0,25 ml no se observó un efecto negativo sobre la motilidad, la morfología o la integridad de acrosoma.

El éxito de centrifugación depende de la duración (10-15 min) y de la fuerza de la centrifugación (350 a 700 x g). Para aumentar la recuperación del espermatozoide se ha reportado el uso de centrifugación a alta velocidad con un amortiguador (20 min, 1000 xg) (Knop, Hoffmann, Rath, & Sieme, 2005); sin embargo, esta técnica no tuvo gran efecto sobre la fertilidad. Aunque se ha demostrado el efecto deletéreo del plasma seminal sobre los espermatozoides durante la criopreservación ((Moore, Squires, & Graham, 2005) *et al.* 2005), La retención del 5-20% del plasma seminal en la suspensión después de la centrifugación se ha considerado esencial para criosupervivencia (Sieme, et al., 2008).

Para congelar el semen, actualmente se utilizan diversos equipos que en su mayoría se basan en la contención de nitrógeno líquido, los cuales generan un medio para la criopreservación de hasta -196 °C. Estos se pueden encontrar en diferentes

presentaciones, bien sea en termos convencionales de diferentes tamaños, cajas de poliestireno Styrofoam® e incluso sistemas de congelación programables. Aunque todos los equipos han demostrado ser efectivos en el proceso de criopreservación, Clulow et al en 2008, demostraron que la motilidad después de la descongelación de los espermatozoides congelados en el equipo de congelación programable, fue consistentemente más alta que los espermatozoides congelados en las cajas de poliestireno.

2.4. Crioprotectores

A raíz de todos los daños causados a la célula por el proceso de criopreservación, se ha incluido en los protocolos de congelación el uso de crioprotectores. La habilidad de un determinado compuesto para actuar como un crioprotector efectivo, depende tanto de su capacidad para proteger las células del daño generado durante la congelación, como de tener una muy baja toxicidad para éstas. Otras características adicionales son su peso molecular y la solubilidad del compuesto en el agua (Fuller, 2004).

Los crioprotectores incrementan el volumen de la solución no congelada en la que se encuentra la célula y disminuyen la concentración de sal de dicha solución, reduciendo por lo tanto el daño que ocurre por deshidratación, sin embargo, debido a que los crioprotectores son menos permeables que el agua y son adicionados en concentraciones molares, inducen grandes, aunque pasajeros gradientes osmóticos a través de las membranas plasmáticas cuando se añaden a las células antes del congelamiento y cuando son removidos en el descongelado, lo cual puede dañar al espermatozoide (Moore, Squires, Bruemmer, & Graham, 2006).

El mecanismo de acción por el cual los crioprotectores logran la mencionada viabilidad celular, se da gracias a que disminuyen la concentración intra y extracelular de los electrolitos, previenen la excesiva deshidratación celular a temperaturas bajo cero y reducen la formación de cristales de hielo intracelular durante el proceso de congelación. Por otro lado, inhiben la actividad de enzimas presentes en la membrana de los espermatozoides, disminuyendo o eliminando de esta manera la formación de radicales libres, los cuales son responsables de la lisis celular que puede ocurrir antes durante y después del proceso de congelación de las células espermáticas (Neira, Ramírez, García, & García, 2007).

En presencia de un crioprotector, la cantidad de agua que permanece en estado líquido a medida que la temperatura desciende es mayor, por lo tanto, la concentración de electrolitos no aumenta en grandes cantidades. Lo anterior está relacionado directamente con la concentración molar del crioprotector, y con la cantidad de agua no congelada que permanece en el espacio extracelular ya que la

disminución de los canales líquidos causa un estrés físico sobre las células ya contraídas e incrementan el contacto célula – célula, lo cual resulta perjudicial para la criopreservación (Muiño, Tamargo, Hidalgo y Peña 2009).

Se conoce gran cantidad de agentes crioprotectores, los cuales están clasificados en dos grandes grupos; aquellos denominados penetrantes y los no penetrantes, es decir, algunos agentes ejercen su función intracelular (penetrantes) y aquellos que trabajan a nivel extracelular (no penetrantes) (Arifantini, Purwantara, Yusuf, & Sajuthi, 2010).

2.4.1. Dimetilformamida

La dimetilformamida es un crioprotector de creciente uso en la criopreservación del semen equino, se considera un crioprotector penetrante a nivel celular y de bajo peso molecular.

Actualmente se sugiere que el crioprotector ideal debería ser aquel con bajo peso molecular, gran solubilidad en el agua y una mínima toxicidad. Debido a que la mayoría de las amidas tienen un bajo peso molecular, comparadas con el glicerol, estos crioprotectores pueden inducir un daño osmótico menor.

Existen datos limitados sobre el uso de las amidas como crioprotectores. Recientes ensayos de fertilidad realizados, muestran un significativo incremento en la fertilidad del semen equino congelado con dimetilformamida cuando es comparada con el glicerol (Vidament *et al.*, 2002); Medeiros *et al.*, 2000); (Moffet, Bruemmer, Card, & Squires, 2003).

El uso de dimetilformamida como crioprotector en diluyentes de congelamiento para semen equino, ha proporcionado un aumento en la motilidad en el descongelamiento y una preservación de la integridad de la membrana celular mayor que el glicerol (Vidament *et al.*, 2002);(Mesa & Henao R, 2012), ofreciendo una alternativa para mejorar la respuesta del patrón de motilidad e integridad celular para aquellos reproductores que congelan pobremente cuando se usa el glicerol (M. A. Alvarenga, F. Papa, F. Landim-Alvarenga, & A. S. L. Medeiros, 2005).

2.4.2 Dosis en los diluyentes

La concentración de la dimetilformamida varía de 2 a 6% v/v (0.2±0.8 M). Sin embargo Vidament *et al.* en 2002, demostraron que a una concentración de 2% se

observaba una buena tasa de fertilidad, incluso en los casos donde se observó una disminución en la motilidad utilizando este tipo de crioprotector.

2.4.3 Mecanismo de acción como crioprotector

El mecanismo de acción de la dimetilformamida se relaciona mucho con el del glicerol, jugando un papel fundamental en la integridad estructural de membranas y organelas, durante y después de la descongelación, sin embargo la diferencia fundamental entre estos dos compuestos es que la dimetilformamida tiene un peso molecular más bajo que el glicerol (73.09 g/mol) y por ende entra más fácil y rápidamente a la célula espermática, disminuyendo de esta manera el estrés osmótico (Peña *et al.*, 2011).

En un experimento realizado en eyaculados de trece reproductores por Vidamet *et al.*, en 2002, encontraron que el uso de dimetilformamida al 2% es un crioprotector adecuado para mantener la motilidad y capacidad fertilizante del semen equino. En otros varios experimentos (M. Alvarenga, F. Papa, F. Landim-Alvarenga, & A. S. L. Medeiros, 2005), ha evidenciado que las amidas protegen a los espermatozoides del daño ocasionado por la congelación, y esta habilidad está mayormente marcada por la calidad al post-descongelado de semen proveniente de reproductores que se afectan cuando son congelados con glicerol. Los ensayos de fertilidad con amidas revelan que estas podrían ser menos contraceptivas que el glicerol, aún para los sementales “buenos congeladores”, mejorando su fertilidad; ya que es posible que la menor viscosidad de las amidas y su bajo peso molecular, favorezcan una permeabilidad aumentada hacia el interior de la membrana plasmática, resultando en un menor daño osmótico del espermatozoide.

2.4.4 Efectos adversos de la dimetilformamida

Hasta el momento no se han reportado efectos adversos de la dimetilformamida. Esto puede deberse a su bajo peso molecular y a la consecuente baja osmolaridad que la misma produce, sin embargo no hay que dejar de tener en cuenta la posibilidad de que al aumentar de manera significativa la concentración, se pueda llevar a un aumento en la osmolaridad y por ende someter a las células espermáticas a un estrés osmótico.

2.5. Evaluación del semen equino

El objetivo del examen reproductivo del macho es determinar si el semental tiene las capacidades tanto físicas como mentales para producir un eyaculado que tengan

espermatozoides viables y libres de enfermedades infecciosas. No solo se debe evaluar la cantidad y la calidad, sino también la libido y la habilidad de copular del semental, identificando problemas físicos, congénitos y de fertilidad (Varner, 2008).

La evaluación del eyaculado debe ser realizada de una manera minuciosa, evaluando las características físicas. Se debe tener presente que se han desarrollado diferentes técnicas para evaluar las características del semen. Del mismo modo es necesario tener en cuenta que el análisis arroja como resultado algunos indicios del potencial de fertilización del semental, sin embargo, algunos autores sostienen que ninguna prueba de laboratorio tiene una correlación directa y confiable con respecto a la fertilidad del reproductor (J. K. Graham, 2001). El mismo autor sostiene que el problema en la correlación de las pruebas de laboratorio con la fertilidad *in-vivo*, se da por el número total de espermatozoides utilizados en cada inseminación.

Según Graham en el 2001, para que la evaluación de semen a nivel de laboratorio o campo sea útil, debe ser:

1. Objetiva: Que la prueba tenga poco margen de error humano.
2. Repetible: Obtener resultados similares al repetir las pruebas.
3. Precisa: Evaluar las características espermáticas con precisión
4. Rápida: Poder realizar el procesos de manera rápida sin implicar errores
5. De bajo costo: Aunque este criterio no es aplicable siempre; no es indispensable

La célula espermática es compleja, ya que tiene que poseer una cantidad de condiciones para lograr la fertilización, tales como: la motilidad, integridad del acrosoma, habilidad de unirse a la zona pelucida, aberraciones del núcleo entre otras. Por tal razón las fallas en la fertilización de un espermatozoide son multifactoriales, en un mismo reproductor, inclusive en un mismo eyaculado. Las pruebas seminales son importantes pero no son un reflejo exacto de la realidad ni de la condición fértil del semental, aunque si indican el potencial del reproductor lo cual resulta muy importante para la congelación del semen (J. K. Graham, 2001).

Uno de los puntos más importantes es la conformación anatómica normal del tracto reproductivo del semental, teniendo en cuenta la conformación normal de la especie, que es la base del adecuado funcionamiento. Por motivos de metodología del trabajo, solo se referencian los testículos ya que son los encargados de la producción de espermatozoides, que es finalmente el factor determinante para seleccionar el semental apto para la congelación seminal.

Para poder seleccionar un semental para congelación seminal se debe tener presente que los parámetros reproductivos deben estar como mínimo en el límite inferior de los parámetros normales de la especie; motilidad espermática progresiva mayor a 60%, concentración espermática de 60 millones de espermatozoides por ml (Braun, Sakai, Hochi, & Oguri, 1994);(Guarín & María, 2010)

La evolución del eyaculado debe ser realizada de una manera minuciosa, evaluando las características físicas. Es necesario tener en cuenta que el análisis arroja como resultado algunos indicios del potencial de fertilización del semental, sin embargo hay autores que sostienen que ninguna prueba de laboratorio tiene una correlación directa y confiable con respecto a la fertilidad del reproductor. El problema en la correlación de las pruebas de laboratorio con la fertilidad *in-vivo*, se da por el número total de espermatozoides utilizados en cada inseminación (J. K. Graham, 2001).

A nivel de laboratorio y de campo se debe realizar un análisis del eyaculado, el cual debe incluir principalmente conteo total de espermatozoides, calidad espermática; analizando la morfología y motilidad espermática (incluyendo porcentaje de motilidad total, motilidad progresiva, además de velocidad en promedio del espermatozoide y finalmente longevidad en la motilidad después de almacenado *in-vitro*. Otros factores del semen deben ser evaluados como presencia de sangre (hemospermia), presencia de orina (uroespermia) y de enfermedades de transmisión sexual (Varner, 2009).

2.5.1. Aspecto

Para poder determinar o evaluar el aspecto del eyaculado se debe tener en cuenta principalmente el color y la consistencia del mismo. Para poder realizar una adecuada evaluación se debe tener la porción libre de gel. Debido a la diferencias entre individuos, se ha determinado que el semen tiene un color que varía de gris ceniza a blanco. Por otro lado la consistencia va desde acuoso a lechoso (Palma, 2006). Cualquier cambio en la coloración (fuera de lo normal) sirve de indicio para sospechar de alteraciones tales como la hemospermia y uroespermia, entre otras.

2.5.2. pH

Está establecido que el pH del semen equino fluctúa entre 6,2 y 7,8. Para poder obtener resultados confiables se debe tomar el pH inmediatamente después de la colección con la ayuda de una cinta de medición de pH. El reposo lleva a que se presente una acumulación de ácido láctico. Generalmente las alteraciones del pH en los equinos sugieren infecciones del tracto reproductivo o presencia de orina en el eyaculado (Calvete et al., 1994).

2.5.3. Motilidad total

Para determinar la motilidad espermática la técnica más comúnmente utilizada es visual; con un microscopio de luz se estima el porcentaje de espermatozoides móviles. Esta prueba además de ser la más común en la mayoría de situaciones de laboratorio, es la única en campo para evaluar dicho parámetro.

Se ha determinado que aun cuando esta prueba es de gran utilidad para el médico veterinario, algunos autores afirman que no hay una correlación directa entre la motilidad y la capacidad de fertilización de la muestra en cuestión (J. K. Graham, 2001).

El objetivo principal de esta prueba es determinar la proporción motil de espermatozoides y la proporción motil progresiva de los mismos. Se debe tener presente que la porción abaxial de la pieza media del espermatozoide equino puede producir una especie de movimientos circulares, lo cual ocurre en el espermatozoide sano. El inconveniente con este tipo de pruebas es la subjetividad de los resultados y la alta posibilidad de encontrar errores humanos (Sieme, et al., 2008).

La determinación de la motilidad espermática debe ser realizada durante los siguientes 5 minutos siguientes después de la colecta, ya que después de este periodo de tiempo se presenta una alteración de los valores normales de la muestra (Brass & Palma, 2001).

Para obtener resultados más confiables, se debe evaluar la motilidad tanto en semen sin diluyente o *in-natura* como el semen diluido. Esto permite al médico veterinario tener un aproximado más exacto de cómo es el comportamiento del mismo, bajo sustancias diluyentes utilizadas (Varner, 2008)

Actualmente existen pruebas basadas en el análisis de un computador para evaluar muestras seminales en diferentes especies, incluyendo la especie equina. Esta prueba

es llamada "CASA". Estas pruebas permiten una mayor exactitud en la interpretación de la muestra como tal y de los resultados obtenidos y son de gran utilidad cuando de motilidad se trata, ya que permiten evaluar con una gran exactitud los espermatozoides motiles progresivos y las velocidades de los mismos. Permiten una evaluación más precisa de la cinética de los espermatozoides y medir con precisión parámetros tales como velocidad en línea recta, velocidad curvilínea, promedio de velocidad en un tramo y desplazamiento lateral de la cabeza (Sieme, et al., 2008).

2.5.4. Concentración

La concentración espermática es una medición la cual se basa en el número de espermatozoides por unidad de volumen. Para obtener este valor se puede utilizar principalmente dos métodos; por una lado existe la utilización de la cámara de Neubauer y por otro, la utilización de un espectrofotómetro (Brass & Palma, 2001).

2.5.5. Morfología

Para la clasificación de la morfología espermática se han desarrollado una gran variedad de pruebas. Para determinar la morfología espermática con un microscopio de luz, se puede realizar una prueba con o sin tinción. Por motivos de practicidad se emplea la evaluación morfológica de los espermatozoides con tinción ya que facilita el procedimiento (Sieme, et al., 2008). Para una adecuada preparación de la muestra (condiciones de tinción) se debe precalentar tanto la eosina Nigrosina como la lámina; además es necesario utilizar semen filtrado y libre de gel. Como mínimo se debe observar 100 espermatozoides bajo el lente de inmersión. Algunos autores recomiendan incrementar el número de espermatozoides a 300, ya que incrementan la precisión de la prueba. Card utiliza la misma tinción de Negrosina Eosina como método para identificar y diferenciar espermatozoides vivos y muertos; esto se debe a que las células que se tiñen de rojo se consideran muertas, mientras que las células que no se tiñen son las que estaban vivas (Card, 2005).

En términos generales se ha establecido que las alteraciones del acrosoma no debe sobrepasar el 5%, alteraciones de la cabeza del espermatozoide no deben superar el 10% de las alteraciones morfológicas totales. Finalmente se ha determinado que las alteraciones morfológicas totales de la muestra no deben superar el 30 % (Brass & Palma, 2001).

2.5.6. Centrifugación seminal

La remoción de plasma seminal resulta de gran importancia para la congelación de semen equino ya que reportan que aunque el plasma seminal es importante para la viabilidad del espermatozoide, también tiene efectos negativos por lo cual buscan reducir de manera significativa la concentración del plasma seminal en la muestra a ser procesada; una reducción del 12% del plasma seminal conlleva a mejores resultados (Brinsko, Crockett, & Squires, 2000). Otras publicaciones sostienen que para la congelación de semen manejar concentraciones menores a un 5% de plasma seminal conllevan a unos buenos resultados en la congelación de semen equino (Alvarenga et al., 2012). Estudios reportan que la centrifugación puede causar efecto negativo para los espermatozoides, pero se encontró que manejar una centrifugación de 600 g x 10 minutos, no trae efectos negativos para el espermatozoide y por el contrario es beneficioso para el proceso de congelación (Alvarenga, et al., 2012).

2.5.7. Sistema computarizado de análisis seminal

La evaluación del semen tradicional, tanto en el pasado como en la actualidad, se ha realizado por medio del microscopio. La primera se hizo posible en 1978, cuando von Leeuwenhoek examinó los movimientos del esperma utilizando un microscopio de luz, sin embargo en 1985 se lanzó al mercado el primer sistema computarizado asistido de análisis de semen CASA con el nombre comercial CellSoft™ (Amann & Katz, 2004).

Esta tecnología se crea por la necesidad de eliminar la subjetividad en las pruebas seminales, ya que tradicionalmente las pruebas son realizadas con un microscopio de luz y es inevitable que se presente el factor humano ya que se requiere de un especialista o profesional que determine ciertos parámetros. Esta tecnología se desarrolló inicialmente para el análisis de semen en humanos y posteriormente se empleó en el área de la veterinaria (Otero, 2008).

El sistema CASA estandarizó con precisión los perfiles de los espermatozoides para una variedad de características de movimiento (motilidad progresiva, la linealidad y la velocidad). El CASA es un sistema de evaluación de la calidad seminal asistido por computación y avances tecnológicos. El sistema CASA, involucra una cámara de video conectada a un microscopio de interfase y a una computadora digitalizada que toma las imágenes del tamaño y de los movimientos espermáticos (Hirano et al., 2001).

A pesar de que CASA, se ha utilizado durante los procedimientos rutinarios de semen de evaluación a nivel comercial, también ha sido implementado como una herramienta de investigación para los científicos o técnicos interesados en diversos

temas, entre ellos: toxicología, estudios longitudinales, las influencias ambientales, análisis retrospectivo de semen, refrigeración y criopreservación, marcaje de ADN de los espermatozoides, la morfología en relación con características del movimiento, la estructura de la cromatina, la función mitocondrial, análisis de componentes de los diluyentes, eventos de fusión de membrana, la transferencia de genes y la función de los espermatozoides, factores que influyen en la espermatogénesis y la función del epidídimo (Otero, 2008)

El CASA evalúa una serie de parámetros dentro de los cuales se consideran los cinéticos entre los cuales se encuentran:

Porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva: esta medición se da en función de la velocidad curvilínea o de la velocidad media, se clasifican en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos. En el grupo de los móviles también se clasifican como rápidos, medios y lentos (Otero, 2008).

Parámetros que definen la velocidad de los espermatozoides (Mortimer & Maxwell, 1999):

- VCL (velocidad curvilínea): es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en un periodo de tiempo.
- VSL (velocidad rectilínea): es la distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de trayectoria por unidad de tiempo.
- VAP (velocidad media): es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.
- LIN (índice de linealidad): la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y al velocidad curvilínea. Su cálculo se obtiene por la siguiente ecuación $(VSL/VCL) \times 100$.
- STR (índice de rectitud): relación existente entre la velocidad rectilínea y la velocidad lineal. Su cálculo se obtiene por la ecuación: $(VSL/VAP) \times 100$.
- WOB (índice de oscilación): es la relación que se encuentra entre la velocidad lineal y la velocidad rectilínea. Se calcula con la siguiente ecuación: $(VAP/VCL) \times 100$.

Al utilizar un sistema de computarizado de análisis seminal también se puede determinar los parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza del espermatozoide. Por tal motivo resulta importante entender la lectura de las siguientes variables (Mortimer & Maxwell, 1999):

- ALH (amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza): es el desplazamiento que realiza la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria tanto media como lineal.
- BCF (frecuencia de batido): se determina por la frecuencia con la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

2.5.8. Evaluación de la membrana plasmática

El creciente uso de tecnologías de reproducción en los caballos ha aumentado la necesidad de un medio preciso y rentable para determinar la calidad del esperma. La calidad del esperma está estrechamente relacionada con el estado de la membrana plasmática del mismo, ya que esta membrana sirve no sólo como una barrera protectora, sino que también juega un papel fundamental en las interacciones de célula a célula (por ejemplo, la unión al epitelio del oviducto o la penetración de los oocitos). Por lo tanto, la integridad de la membrana plasmática (SIM) es comúnmente evaluada para determinar calidad del semen. Algunos de los procedimientos que se utilizan actualmente para la evaluación de SIM, incluyen la citometría de flujo, un contador de células automatizado y la tinción con eosina-nigrosina (Foster et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, la determinación de la integridad de la membrana espermática puede ser una poderosa herramienta para el análisis de semen. El test Hiposmótico (HOST) ha sido validado para indicar la capacidad funcional de la membrana de los espermatozoides en humanos y de animales domésticos. La respuesta a la prueba HOST indica si la membrana de los espermatozoides en la cabeza y en la pieza intermedia está intacta y bioquímicamente funcional, hecho que se correlaciona positivamente con la motilidad y viabilidad de los mismos. El HOST parece ser un mejor indicador de la integridad de la membrana celular que las tinciones, ya que éste refleja la capacidad de la membrana para establecer el equilibrio osmótico (Nie & Wenzel, 2001).

El procedimiento de HOST es simple y económico. Se basa colocar a los espermatozoides en un medio Hiposmótico. Los espermatozoides bioquímicamente activos incorporan agua de forma activa en el citosol. Los espermatozoides que poseen una membrana plasmática funcional, presentan “swelling” o hinchazón porque mantienen la capacidad de incorporar agua para equilibrarse con el medio que los rodea. Sin embargo, esta capacidad de hinchamiento no tendrá lugar si la membrana de la célula se rompe o se hace muy permeable por las tensiones que se producen. La inflamación provoca cambios en el tamaño celular y la forma, que pueden ser observados mediante microscopía tradicional en semen de algunos mamíferos, como

los humanos, equinos, bovinos y caninos. Una solución hiposmótica óptima debería ejercer un estrés osmótico suficiente como para aumentar el volumen celular de forma observable pero sin provocar la lisis de la membrana espermática (Cabrita, Alvarez, Anel, & Herráez, 1999).

2.5.9. Test hiposmótico

Esta prueba se realizara mezclando 100 µl de semen en 1 ml de sacarosa con una osmolaridad de 100 mOsm/L a una temperatura promedio de 37 ° C donde se mantienen estas condiciones por un periodo de tiempo de 30 minutos. Una vez transcurre dicho periodo de tiempo se fijaran las muestras en 0,5 ml de formol salino tamponado para posteriormente realizar el análisis por vía microscopio de contraste de fase, en un aumento de 1000 X. El resultado se tomara evaluando 100 células, tomando como positivo aquellas células que presenten el “swelling” descrito anteriormente (Mantovani, Rota, Falomo, Bailoni, & Vincenti, 2002)

2.6. Características seminales del caballo criollo colombiano

Pocos estudios han reportado las características básicas de la evaluación de semen en el caballo criollo colombiano. Debido al enfoque del trabajo en dicha raza, resulta importante evaluar las mismas para así poder determinar los posibles cambios que la modificación de diluyentes con la adición de crioprotectores puede tener en la práctica al congelar reproductores criollos colombianos.

2.6.1 Evaluación del eyaculado del caballo criollo colombiano.

Un estudio realizado en caballos criollos colombianos por Mesa en el 2010, se evaluaron las características básicas tales como volumen, concentración espermática, motilidad estimada y viabilidad, en 10 animales de dicha raza con diferentes edades entre 5 y 16 años.

Se observaron los siguientes resultados:

- Volumen en centímetros: 70.4±2.8.
- Concentración espermática (millones / ml): 209.2±49.1.

- Movilidad total estimada representada en porcentaje: 71.2 ± 11.2 .
- Viabilidad representada en porcentaje: 73.3 ± 6 .

2.6.2 Efecto de la congelación sobre parámetros espermáticos en el caballo criollo colombiano

Mesa en el mismo estudio, realizó una evaluación espermática de los mismos ejemplares con semen fresco y una evaluación post-descongelación, buscando de esta manera evaluar las diferencias que se presentan en cuanto a las características seminales en estos dos estados.

El autor reporta los siguientes resultados:

Tabla 2. Parámetros seminales evaluados con semen fresco y post-descongelamiento (Guarín & María, 2010).

Parámetro	Fresco	Congelado
Viabilidad (%)	73.32	52.67*
Movilidad total estimada (%)	71.20	48.67*
Morfología normal (%)	67.78	43.95*

De acuerdo a lo reportado en la tabla anterior, es evidente que los espermatozoides del caballo criollo colombiano son altamente sensibles a la congelación, por lo que aun más resulta de gran importancia, investigar este tema para poder estandarizar los protocolos utilizados en dicho procedimiento y de igual manera, encontrar el diluyente que cause menos efectos negativos sobre la célula espermática. Del estudio realizado por Mesa se puede determinar que las células sufren los siguientes cambios primordialmente; un incremento en la presentación de alteraciones morfológicas de las células y una reducción considerable de los espermatozoides móviles y vivos. Aunque se está aún lejos de la estandarización de algún protocolo de criopreservación, el autor demostró en su estudio que el uso de dimetilformamida como agente crioprotector, es una buena alternativa para mejorar la movilidad espermática, la integridad de la membrana y la viabilidad (Mesa & Henao R, 2012)

3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación geográfica

El presente estudio se realizó en los municipios de Tabio y Madrid del departamento de Cundinamarca. La zona del estudio se encuentra a 2650 msnm con una temperatura promedio de 16°C

3.2. Criterios de selección de la unidad experimental

Se utilizaron 5 reproductores de la raza Criolla Colombiana previamente seleccionados mediante un examen clínico andrológico, con fertilidad comprobada y sexualmente activos; el rango de edad de los reproductores seleccionados es de 4 a 10 años.

Los caballos seleccionados se evaluaron mediante un examen clínico andrológico; teniendo en cuenta aspectos físicos del animal su comportamiento sexual, libido y características del espermiograma. (Varner, 2008).

Se realizó una serie de colectas diarias durante siete días, logrando un agotamiento extra-gonadal, buscando que los espermatozoides soportaran mejor el procesos de criopreservación (Canisso, Souza, & Ortagiza Escobar, 2008)

De igual manera se tuvo en cuenta la condición corporal de los animales y su hábitat; todos los animales se encontraron en similares condiciones sanitarias, de nutrición y de confinamiento. Los animales seleccionados se encontraron en confinamiento en una pesebrera con unas medidas mínimas de 4 mt por 3 mt. La dieta de los animales fue a base de heno angleton (*Dichantun annulatum*) a voluntad y concentrado en 3 raciones diarias de 1,5 kg c/u de una fábrica de concentrados nacional, agua fresca a voluntad.

3.3. Métodos y procedimiento

3.3.1. Obtención y evaluación del semen pre-congelación

La colecta fue realizada mediante vagina artificial tipo Hannoverina, la cual fue graduada a una presión específica y una temperatura de 52°C, donde el semen es filtrado en el momento de la colecta, es separada la fracción gel del eyaculado de la porción rica en espermatozoides del mismo (Varner, 2008).

Una vez obtenido la porción rica en espermatozoides se procedió a evaluar las características macroscópicas (color, volumen, aspecto y pH) y microscópicas

(motilidad total, motilidad progresiva, vigor y concentración). El color y aspecto se realizó observando la muestra en un tubo cónico y fue evaluada el grado de turbidez de la muestra siendo 0 transparente y 5 blanco cremoso (Varner, 2008).

El volumen fue calculado en una probeta previamente esterilizada, el pH fue medido utilizando una cinta comercial indicadora de pH (Cinta Merck®) y la concentración fue calculada utilizando un espectrofotómetro de alta precisión comercial SpermCue® (Loomis & Graham, 2008).

Las características microscópicas fueron evaluadas utilizando la microscopia óptica convencional con aumento de 400x, evaluando 7 campos visuales para cada una de las características deseadas. La motilidad total será considerada como el porcentaje de células que tengan movimiento en una escala de 0 a 100, la motilidad progresiva se consideraron el porcentaje de células que atraviesen el campo en línea recta en una escala de 0 a 100. El vigor fue evaluado con la fuerza en la cual la célula atraviesa el campo en una escala de 0 (ausente) a 5 (máximo) (Vidament, et al., 2002).

La morfología fue evaluada mediante tinciones vitales utilizando la tinción de eosina nigrosina, rojo congó, verde malaquita y azul de metileno. Se realizó el conteo de 100 células categorizando los defectos morfológicos en alteraciones de cabeza y acrosoma, alteraciones de pieza intermedia, y alteraciones de pieza principal terminal o cola (Brito, 2007).

El eyaculado fue diluido en una proporción de 1:1 con medio diluyente comercial Kenney® sin crioprotector a una temperatura de 37.5°C y fueron evaluadas todas las características espermáticas microscópicas descrita anteriormente (Perez-Osorio et al., 2008).

El semen diluido fue centrifugado a una velocidad de 2.500 rpm lo que corresponde a 600 gaus en un tiempo de 12 minutos, posteriormente se retiró el plasma seminal procurando dejar una capa del mismo que equivale a la cantidad del botón rico en espermatozoides (Perez-Osorio, et al., 2008).

3.3.2. Concentración y ajuste de volumen

Teniendo en cuenta la concentración inicial, se diluyó con INRA 82 de acuerdo al volumen final de semen y número de pajillas deseadas, de esta manera se obtuvo una concentración de espermatozoides de 100×10^6 por pajilla de 0,5 ml; el envasado de las pajillas se realizó de manera manual (Perez-Osorio, et al., 2008).

3.3.3. Congelación

Las pajillas se sometieron a vapores de nitrógeno por 15 minutos, se ubicaron las pajillas a 6 cm del nitrógeno líquido, posteriormente se sumergieron en el nitrógeno líquido por 20 segundos alcanzando una temperatura de -196°C (Medeiros, Gomes, Carmo, Papa, & Alvarenga, 2002)

3.3.4. Curva de descongelación

Las muestras fueron descongeladas para ser evaluadas 10 días pos congelación, la curva de descongelación se realizó a $37,5^{\circ}\text{C}$ por 40 segundos en baño maría. Posterior a esto se realizó la evaluación de todos los parámetros en microscopia óptica y en el método CASA (Mesa & Henao R, 2012).

3.3.5. Evaluación espermática pos-descongelación

La evaluación del semen a la descongelación se realizó con las tinciones citadas anteriormente, además del sistema computarizado de análisis seminal.

3.4. Diseño Estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico utilizando el programa de Statistix 8 la prueba de Shapiro-wills buscando encontrar una distribución normal en la muestras. Se realizó un diseño de bloques completos al azar, donde cada bloque fue la unidad experimental y las medias comparadas a través del test de Tukey. Para las variables que no presentaron una distribución normal, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para comparar las medianas.

TRATAMIENTOS: Congelación de semen equino en diluyente INRA 82 con adición dimetilformamida al 5% en una única etapa de adición (tratamiento 1). Adición fraccionada de dimetilformamida al 5% en un periodo de 10 minutos (tratamiento 2).

RESPUESTA: Determinar el mejor protocolo para la congelación de semen del caballo criollo colombiano.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización del semen fresco de los Caballos Criollos Colombianos

Las características de los eyaculados de 5 caballos criollo colombianos se presentan en la tabla No. 2. El volumen promedio eyaculado es de 36,4 ml, el pH es de 7 y se encontró que la concentración espermática promedio es de $234,2 \pm 68,5$ millones de espermatozoides por ml. Se presentan los datos con las respectivas medias y desviaciones estándar de las variables: motilidad total, motilidad progresiva, vigor, viabilidad y morfología del semen fresco. La motilidad total en semen fresco presentó un promedio de $73 \pm 5,3\%$, la motilidad progresiva fue de $68 \pm 5,3\%$, el promedio de vigor fue de 3, la viabilidad promedio fue de $71,2 \pm 4,18$ y la morfología normal para semen fresco fue de $71,2 \pm 4,3\%$.

Tabla 2. Características de cinco eyaculados de caballos criollos colombianos.

Caballo	Volumen (ml)	pH	Concentración	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	Vigor	Viabilidad	Morfología
C1	55	7	230	70	65	3	71	64
C2	32	7	264	75	70	3	76	74
C3	37	7	154	65	60	3	72	72
C4	15	7	340	80	75	3	73	70
C5	43	7	183	75	70	3	64	76
Media \pm SD	$36,4 \pm 13,8$	7 ± 0	$234,2 \pm 68,5$	$73 \pm 5,3$	$68 \pm 5,3$	3 ± 0	$71,2 \pm 4,18$	$71,2 \pm 4,3$

SD: Desviación Estándar

4.2 Efecto de las diluciones con y sin crioprotector inmediato y fraccionado sobre parámetros seminales

4.2.1 Motilidad total y progresiva

En la evaluación del material espermático fresco para la variable motilidad total presentó un promedio de $73 \pm 5,3\%$ (Tabla 3), en tanto que para la segunda dilución con el crioprotector inmediato mostró una motilidad total de $66 \pm 6,5\%$ y fraccionado

de $57 \pm 13,5\%$. Se observó que las muestras de semen que fueron congeladas con crioprotector inmediato ($48 \pm 13,5\%$), mostraron un aumento en el porcentaje de espermatozoides con motilidad total pos-descongelación en comparación con el semen congelado con el crioprotector fraccionado ($32 \pm 14,4\%$) como se registra en la Figura 1. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de la motilidad total disminuyendo ($P < 0,05$) después del proceso de dilución, congelación, descongelación y entre tratamientos (Tablas 3 y 4).

La variable motilidad progresiva para el semen fresco registró un promedio $68 \pm 5,3\%$ y la adición del crioprotector inmediato presentó un valor de $60 \pm 7,9\%$ y $52 \pm 13,5\%$ para el fraccionado. En las observaciones pos descongelación la motilidad progresiva para el tratamiento inmediato fue $41 \pm 15,5$ y para fraccionado fue de $25 \pm 12,24\%$, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de la motilidad progresiva disminuyendo ($P < 0,05$) después del proceso de dilución, congelación, descongelación y entre tratamientos (Tablas 3 y 4) (Figura 1).

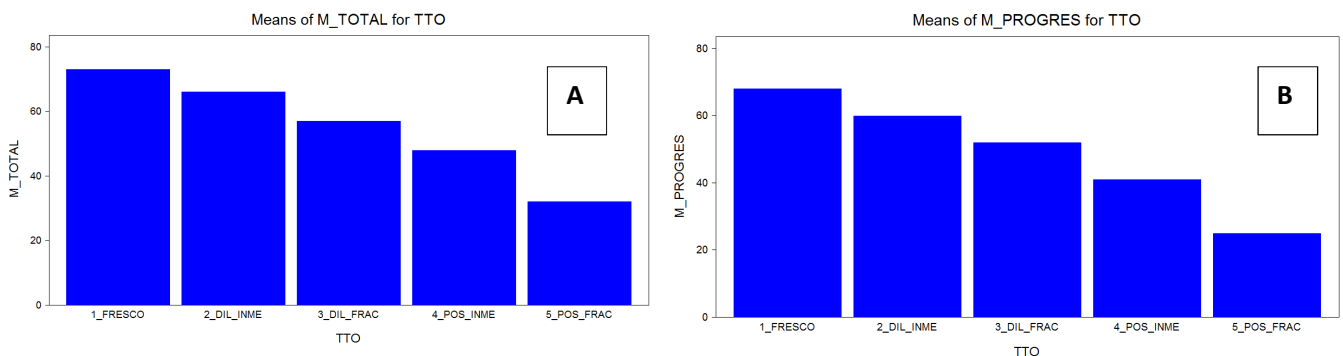


Figura 1. Efecto de las diluciones y la criopreservación sobre la motilidad espermática total y progresiva. La Figura 1A muestra porcentaje de la motilidad total y la Figura 1B muestra el porcentaje de la motilidad progresiva.

Para la variable viabilidad se observó una reducción del semen fresco ($71,2 \pm 4,18$) siendo estadísticamente significativo y comportándose de forma similar para inmediato $52,8 \pm 7,8\%$ y fraccionado $53,6 \pm 13,95^b$ sin ser estadísticamente significativo entre tratamientos como lo muestran las Tablas 3 y 4.

Así mismo se observa una disminución de la morfología seminal normal en fresco ($71,2 \pm 4,18$) comparada con los resultados postdescongelación para inmediato

(59,2±3,8%) y fraccionado (51,2± 8,04%) siendo estadísticamente significativa el análisis pre y pos descongelamiento pero no entre tratamientos como lo muestran las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Efecto de la dilución, crioprotector y la congelación sobre parámetros espermáticos.

VARIABLE	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	Morfología	Viabilidad
FRESCO	73±5,3 ^a	68±5,3 ^a	71,2±4,18 ^a	71,2±4,18 ^a
DILUCIÓN INMEDIATA	66± 6,5 ^{ab}	60± 7,9 ^{ab}	71,2±4,3	71,2±4,18
DILUCIÓN FRACIONADA	57± 13,5 ^{ab}	52± 13,5 ^{ab}	71,2±4,3	71,2±4,18
DESCONGELACION INMEDIATA	48± 13,5 ^{ab}	41± 15,5 ^{ab}	59,2±3,8 ^b	52,8±7,8 ^b
DESCONGELACION FRACIONADA	32± 14,4 ^b	25± 12,24 ^b	51,2± 8,04 ^b	53,6± 13,95 ^b

Las medias con asterisco son significativamente diferentes; P<0,05.

En la tabla 4 se encuentra los promedios de los espermatozoides motiles progresivos rápidos para el tratamiento de dilución inmediato (10,5±2,10%) y fraccionado (13,3± 10,8%), velocidad curvilínea para el tratamiento de dilución inmediato (74,9±4,2 μ/s) y fraccionado (76,1± 6,7 μ/s), velocidad rectilínea para el tratamiento de dilución inmediata (25,74±2,6 μ/s) y fraccionado (26,8± 5,5 μ/s), la velocidad promedio para inmediata (43,8±2,13μ/s) y fraccionado (40,2± 7,6μ/s). Estas variables se comportaron de manera similar sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Así mismo, en la tabla 4 también se encuentra los promedios del índice de linealidad, índice de rectitud, índice de oscilación, lateralidad de cabeza y frecuencia de batida para el tratamiento de dilución inmediata (34,4±3,8; 58,71±3,9; 58,56±3,2; 3,26±0,28 y 6,82±0,44) y fragmentada (35,4±8,4; 66,9± 7,9; 53± 10,5; 3,04±0,41 y 9,76±2,34) respectivamente. Donde las variables presentaron resultados similares sin ser estadísticamente significativas entre tratamientos, excepto por la variable índice de rectitud.

Tabla 4. Parámetros seminales pos descongelación.

VARIABLE	SIGLA	INMEDIATO	FRACCIONADO
		Media±SD	Media±SD
MOTILIDAD TOTAL (%)	MT	48± 13,5 ^a	32± 14,4 ^b
MOTILIDAD PROGRESIVA (%)	MP	41± 15,5 ^a	25± 12,24 ^b
MOTILES PROGRESIVOS RAPIDOS	MPR	10,5±2,10	13,3± 10,8
VELOCIDAD CURVILÍNEA	VCL	74,9±4,2	76,1± 6,7
VELOCIDAD RECTILÍNEA	VSL	25,74±2,6	26,8± 5,5
VELOCIDAD PROMEDIO	VAP	43,8±2,13	40,2± 7,6
ÍNDICE DE LINEALIDAD	LIN	34,4±3,8	35,4± 8,4
ÍNDICE DE RECTITUD	STR	58,71±3,9 ^b	66,9± 7,9 ^a
ÍNDICE DE OSCILACIÓN	WOBt	58,56±3,2	53± 10,5
lateral de la cabeza	ALH	3,26±0,28	3,04±0,41
Frecuencia de Batida	BCF	6,82±0,44	9,76±2,34
MORFOLOGIA	MORF	59,2±3,8	51,2± 8,04
VIABILIDAD	VIA	52,8±7,8	53,6± 13,95
HOST	HOST	39,4± 14,6	47± 0,44

Las medias con asterisco son significativamente diferentes; $p < 0,05$

Los resultados de la prueba hiposmótica no reporta diferencias estadísticamente significativos para los tratamientos inmediato (39,4±14,6%) y fraccionado (47±0,44%).

5. DISCUSIÓN

La investigación desarrollada en el área de la biotecnología de la reproducción ha llevado a estandarizar diferentes protocolos en las técnicas aplicadas; La refrigeración y criopreservación de las células espermáticas de *Equus caballus* no ha sido la excepción, por lo que se encuentran cantidad de estudios de dicho proceso y su posterior utilización (Peña, et al., 2011). La mayoría de las investigaciones abarcan desde los protocolos hasta la elección de los diferentes diluyentes disponibles y su interacción con los crioprotectores, por lo que resulta indispensable la adecuada elección del diluyente para mejorar las tasas de preñez (Mesa, 2010).

Como fue mencionado anteriormente también se debe tener presente el crioprotector empleado en el proceso de criopreservación; aspectos como la concentración y el mecanismo de acción de los mismo son clave para disminuir el estrés osmótico y daños causados a la célula espermática por el proceso de refrigeración, congelación y descongelación. Diversos autores reportan que la dimetilformamida adicionada a los diluyentes a una concentración de 5% como agente crioprotector disminuyen de manera significativa los efectos negativos mencionados anteriormente (Medeiros et al. 2002).

Los resultados en la tabla 3 evidencian que durante el proceso de congelación y posterior a este, se producen alteraciones celulares que tienen como efecto una reducción en la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco. Según Según Parks & Graham (1992); Watson (2000), esta reducción de la fertilidad está relacionada con dos factores principalmente; la muerte de aquellas células que no soportan el proceso de congelación y descongelación y aquellas células que sufren una disfunción no letal (Samper, 2008).

El análisis de los 5 eyaculados registraron valores seminales normales para la especie; el volumen de las muestras colectadas fluctuó entre 15 y 55 ml, teniendo en cuenta la respuesta individual de los equinos. El porcentaje de motilidad total reportado en este estudio oscilo entre 65% y 80, la concentración espermática estuvo en un rango entre 154 a 264 millones de espermatozoides por mililitro, concordando con los valores reportados por diferentes autores para Caballos Criollos Colombianos. (Mesa, 2010) (Restrepo, Ocampo, & Velásquez).

En el proceso de adición del diluyente con crioprotector se observó una disminución en la motilidad total sin cambios estadísticamente significativos ($P < 0,05$), estos resultados son contrarios a lo reportado por Leite (2012) y Parra (2013) quienes reportan cambios significativos en la adición del crioprotector probablemente por el uso de glicerol, al tener posiblemente efectos tóxicos sobre la célula espermática con o sin

el proceso de congelación (Demick *et al*, 1976). En el presente trabajo se utilizaron amidas (DMF) que han demostrado ser más eficaces como agentes crioprotectores en comparación con el glicerol, al tener bajo peso molecular, alta solubilidad en agua y baja toxicidad cumple con las condiciones ideales de un crioprotector. Lo anterior permiten que la penetración a la célula por parte del crioprotector se rápida y eficiente, por lo que previene cambios drásticos en el volumen celular, ayudando a la sobrevivencia de mayor número de células y preserva la funcionalidad de un mayor cantidad de las mismas. Por tal motivo se encuentran menores cambios morfológicos, en motilidad y en integridad en las células espermáticas, correlacionándose con los resultados obtenidos en este estudio y con otros estudios que comparan el glicerol y la dimetilformamida como crioprotector (Medeiros *et al*, 2003; Alvarenga *et al*, 2004; Mesa, 2010).

Las muestras de semen descongeladas con adición de crioprotector inmediata mostraron un porcentaje de espermatozoides con motilidad total pos-descongelación superior ($48 \pm 13,5\%$), en comparación con el semen descongelado con adición de crioprotector ($32 \pm 14,4\%$) (Figura 1), siendo estadísticamente significativo entre tratamientos ($P < 0,05$) (Tabla 4). La variable motilidad progresiva al ser descongelado en adición inmediata fue $41 \pm 15,5\%$ y para la descongelación de la adición fraccionada fue $25 \pm 12,24\%$, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos como se observa en la Figura 1 ($P < 0,05$) (Tabla 3 y 4). Estos resultados son contrarios a los reportados por Mello (2005) y Pérez (2006) donde la adición fraccionada fue más eficaz en la preservación de la motilidad progresiva total, la integridad en la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática estructural de plasma y el acrosoma y un mayor tiempo de supervivencia a la prueba de termo resistencia probablemente asociados a cambios abruptos de osmolaridad, y sensibilidad de la célula espermática del caballo criollo colombiano, aspectos como individualidad, baja presión de selección, e inbreeding del caballo criollo frente al proceso de criopreservación y a la crío-injuria que ocurre inmediatamente las células entran en contacto con el crioprotector.

Cabe resaltar que los ensayos realizados por Mello (2005) y Pérez (2006) la evaluación de la motilidad total y progresiva se realizó por microscopio óptico por lo tanto fue una evaluación subjetiva frente al sistema computarizado utilizado en el presente trabajo, probablemente afectando la exactitud, confiabilidad de los datos.

En el estudio de Pérez en 2006, no se realizó adición inmediata del crioprotector, pero en los tratamientos de adición fraccionada del crioprotector la motilidad total no supero el 40% lo cual es similar a los hallazgos del presente estudio. Además no se realizó una refrigeración previa a la adicción del crioprotector como lo reporto Mello en

2005 obteniendo motilidades superiores tanto para adicción fraccionada e inmediata sin ser estadísticamente significativas.

Sumado a esto se debe tener en cuenta que la variabilidad en los resultados se debe a que en la especie equina algunos ejemplares muestran mayor sensibilidad a la criopreservación seminal debido al alto grado de individualidad (Alvarenga, 2003).

6. CONCLUSIONES

Las características seminales evaluadas en el semen fresco de los Caballos Criollos Colombianos del presente estudio, son similares a las de caballos de otras razas; cumpliendo con los parámetros mínimos para realizar diversos procedimientos de biotecnología de la reproducción.

Los reproductores seleccionados para el estudio cumplen con los requisitos de la raza para ser congelados al ser comparados con otros estudios realizados en el caballo criollo colombiano.

Los cambios que sufren las células espermáticas en el proceso de criopreservación tienen efectos negativos sobre los diferentes parámetros espermáticos analizados, al compararlos con el semen pre-congelación, inclusive en presencia del crioprotector. Lo cual indica que el crioprotector y/o los protocolos empleados necesitan de mayor estudio para lograr mejores resultados en la criopreservación de células espermáticas de los equinos.

Aunque la adición fraccionada de dimetilformamida cumple con la función de preservar las células espermáticas en el Caballo Criollo Colombiano en los procesos de criopreservación, la motilidad total y progresiva es inferior al ser comparada con la adición en una aplicación única del mismo crioprotector.

Probablemente por lo reportado por diferentes autores la adición fraccionada mejora la motilidad de las células espermáticas siempre y cuando se emplee una curva de refrigeración por un tiempo determinado antes de los vapores de nitrógeno.

El uso de la DMF al 5% asociado con INRA 82 en estado de refrigeración y congelación demostró ser un protocolo eficiente para la criopreservación espermática del Caballo Criollo Colombiano, no obstante los resultados difieren de los de otros autores, por tal motivo resultaría indispensable realizar pruebas de preñez (*in-vivo*) para poder obtener resultados más fieles y así evaluar los protocolos.

Las técnicas empleadas para evaluar la calidad espermática resultan de gran utilidad, máxime si se logra disminuir el factor subjetividad; de tal manera que el sistema computarizado de análisis seminal aporta de manera significativa a la evaluación de los diferentes diluyentes, crioprotectores y protocolos de congelación.

Los estudios relacionados con la criopreservación en el Caballo Criollo Colombiano son deficientes, lo cual resulta en una falta de información a la hora de aplicar los protocolos al proceso, teniendo como resultado una alta variabilidad en las respuestas individuales. Por tal motivo resulta importante profundizar en el área en cuestión para estandarizar protocolos y de esta manera reducir en lo posible la variabilidad individual.

7. LISTA DE REFERENCIAS

- Almeida, J., & Ball, B. A. (2005). Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal reproduction science*, 87(3), 321-337.
- Alvarenga, M., Papa, F., Landim-Alvarenga, F., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1), 105-113.
- Alvarenga, M. A., Papa, F., Landim-Alvarenga, F., & Medeiros, A. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Carmo, M. T., Kievitsbosch, T., Castro Chaves, M. M. B., & Ramires Neto, C. (2012). Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 424-429.
- Amann, R. P., & Katz, D. F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of andrology*, 25(3), 317.
- Arata-Bellabarba, G., Osuna, J. A., Gómez, R., & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática: Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 3(3), 12-19.
- Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Yusuf, T. L., & Sajuthi, D. (2010). Effect Of Different Cryoprotective Agents On Skim Milk And Dimitropoulus Extender For Stallion Semen Cryopreservation. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 35(1), 68-74.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal reproduction science*, 107(3), 257-267.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of andrology*, 24(4), 621.
- Boiso. (2001). Principios básicos de Criobiología.
- Brass, K., & Palma, G. (2001). Inseminación artificial en la especie equina. *Bioteconología de la Reproducción*.
- Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., & Oguri, N. (1994). Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41(4), 809-818.
- Brinsko, S., Crockett, E., & Squires, E. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54(1), 129-136.
- Brito, L. F. C. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249-264.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, E., & Herráez, M. (1999). The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal reproduction science*, 55(3), 279-287.
- Calvete, J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E., & Töpfer-Petersen, E. (1994). Isolation and Biochemical Characterization of Stallion Seminal-plasma Proteins. *Reproduction in Domestic Animals*, 29(5), 411-426.
- Canisso, I. F., Souza, F. A., & Ortagiza Escobar, J. M. (2008). Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev. investig. vet. Perú*, 19(2), 113-125.
- Card, C. (2005). Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology*, 64(3), 558-567.
- Clulow, J., Maxwell, W., Evans, G., & Morris, L. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian veterinary journal*, 85(6), 232-235.

- Foster, M., Varner, D., Hinrichs, K., Teague, S., LaCaze, K., Blanchard, T., & Love, C. (2011). Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. *Theriogenology*, 75(8), 1499-1505.
- Fuller, B. J. (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters*, 25(6), 375-388.
- Graham, J. K. (1996). Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 12(1), 119.
- Graham, J. K. (2001). *Assessment of sperm quality*. Paper presented at the International Symposium on Stallion Reproduction.
- Graham, L., Bando, J., Gray, C., & Buhr, M. (2004). Liquid storage of Asian elephant (*Elephas maximus*) sperm at 4° C. *Animal reproduction science*, 80(3), 329-340.
- Guarín, M., & María, A. (2010). *Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Hirano, Y., Shibahara, H., Obara, H., Suzuki, T., Takamizawa, S., Yamaguchi, C., . . . Sato, I. (2001). ANDROLOGY: Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 18(4), 215-220.
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., & Sieme, H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal reproduction science*, 125(1), 112-118.
- Ijaz, A., & Ducharme, R. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 C. *Theriogenology*, 44(7), 1039-1050.
- Knop, K., Hoffmann, N., Rath, D., & Sieme, H. (2005). Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 294.
- Loomis, P., & Graham, J. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science*, 105(1), 119-128.
- Macías García, B., Ferrusola, C. O., Aparicio, I., Miró-Morán, A., Rodríguez, A. M., Bolaños, J., . . . Tapia, J. (2012). Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*.
- Mantovani, R., Rota, A., Falomo, M. E., Bailoni, L., & Vincenti, L. (2002). Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reproduction Nutrition Development*, 42(3), 217-226.
- Maxwell, W., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, fertility and development*, 5(6), 613-638.
- Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M., Papa, F., & Alvarenga, M. A. (2002). Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58(2-4), 273-276.
- Mesa, A. M., & Henao R, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2908-2915.
- Moffet, P., Bruemmer, J., Card, C., & Squires, E. (2003). *Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa*. Paper presented at the Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference, P 42.

- Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J., & Graham, J. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26(5), 215-218.
- Moore, A., Squires, E., & Graham, J. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(9), 2372-2381.
- Morel, M. C. G. D. (2005). Breeding Globally--AI Advances. *The Horse, Article #15642*.
- Mortimer, S., & Maxwell, W. (1999). Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, fertility and development*, 11(1), 25-30.
- Neira, J. A., Ramírez, G. F., García, S. A. L., & García, D. A. M. (2007). EFECTO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA-ETILENGLICOL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO Revista de Medicina Veterinaria, julio-diciembre, número 014 Universidad de La Salle Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*(14), 93-105.
- Nie, G. J., & Wenzel, J. (2001). Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55(4), 1005-1018.
- Olivieri, B. T., Love, B. C., Rezabek, G. B., Lamm, C. G., Varner, D. D., Payton, M. E., & Holyoak, G. R. (2011). Effect of Antibiotic-containing Extenders on *Taylorella equigenitalis* Contaminated Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(11), 655-660.
- Otero, R. M. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas*: Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico.
- Parks, J., & Graham, J. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.
- Peña, F., Macías García, B., Samper, J., Aparicio, I., Tapia, J., & Ortega Ferrusola, C. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76(7), 1177-1186.
- Perez-Osorio, J., Mello, F., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L., & Henry, M. (2008). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction*, 5(3/4), 103-109.
- Restrepo, G., Ocampo, D., & Velásquez, A. EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE CABALLOS CRIOLLO COLOMBIANO POR UN SISTEMA ANALIZADOR DE CLASE ASSESSMENT OF CRYOPRESERVED SPERM MOTILITY FROM COLOMBIAN CREOLE STALLIONS BY SPERM CLASS ANALYZER.
- Rota, A., Furzi, C., Panzani, D., & Camillo, F. (2004). Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(2), 103-109.
- Samper, J., & Morris, C. (1998). Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49(5), 895-903.
- Shaw, J., & Jones, G. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583-605.
- Sieme, H., Harrison, R., & Petrunkina, A. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal reproduction science*, 107(3), 276-292.
- Squires, E. L. (1999). Cooled and frozen stallion semen.
- Varner, D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, 70(3), 448-462.
- Vidament, M., Daire, C., Yvon, J., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., & Ecot, P. (2002). Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, 58(2-4), 249-251.
- Vidament, M., Dupere, A., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., & Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48(6), 907-917.

- Volonté, D., Galbiati, F., Pestell, R. G., & Lisanti, M. P. (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr14) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-src kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8094-8103.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.