

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto del medio Lactosa EDTA-plasma seminal en la  
criopreservación de Espermatozoides de *Equus  
caballus* “potro”**

TESIS PARA OPTAR

EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA

CAROLINA MARINA RODRÍGUEZ SARRIA

LIMA-PERÚ

2007

## DEDICATORIA

A mi abuelo, por ser la fuerza y luz que me acompaña día a día.

A Pepe, por darme toda su confianza, creer en mí y ser mi guía.

A Loren, por enseñarme lo que es ser una mujer íntegra y fuerte.

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Gonzáles, jefe del Laboratorio de Fisiología y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, por brindar sus instalaciones para la elaboración de la tesis.

Al Msc. Mauricio Gonzáles Molfino por sus consejos científicos y personales y haber accedido a la asesoría de la presente.

Al Dr. Tomas Agurto y los Blgs. Alcides Guerra y Juan Carlos Ramos, integrantes del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, por brindar los equipos necesarios para la elaboración de la tesis.

Al Profesor César Puicón por la ayuda brindada en el área de Estadística.

A la Srta. Giuliana Bendezú y a todo el personal que labora en el Camal de Equinos “Casablanca” en Lurin.

Al Sr. Christian Torres, por su gentil colaboración en la proporción del plasma seminal.

Al Sr. Alfredo Reynoso, por su amistad, sus consejos, su gentil colaboración y apoyo en la colecta de muestras en Lurín.

A la Srta. Grissel Faura por su amistad, alegría compañía y por su apoyo en la colecta de muestras.

A la Srta. Livia Bartolo por su amistad, por sus consejos y las largas conversaciones mantenidas a lo largo de la tesis.

## RESUMEN

La siguiente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de plasma seminal en el medio Lactosa EDTA utilizado en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de potro. Para ello, las muestras fueron evaluadas en 2 momentos: pre y post congelamiento.

En el post congelamiento se realizaron 2 evaluaciones una que se tomó como control para las muestras que conservan plasma seminal, y tratamiento para las muestras que fueron centrifugadas y de las cuales el plasma ha sido eliminado.

En el grupo control, la presencia de plasma seminal, demuestra que a pesar del bajo porcentaje de espermatozoides móviles que se observaron ( $8.75\% \pm 5,2$  control vs.  $2.5\% \pm 2,6$  tratamiento), existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $P=0.006$ ). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en vitalidad ( $9.1\% \pm 5,3$  control vs.  $12.5\% \pm 10,5$  tratamiento) ( $P=0.339$ ); en morfología: anomalías de cabeza  $12.6\% \pm 6,2$  control vs.  $8,6\% \pm 3,2$  tratamiento ( $P=0.113$ ); anomalía de cuello  $5,5\% \pm 2,3$  control vs.  $7,6\% \pm 4,5$  tratamiento ( $P=0.107$ ), anomalía de cola  $46,6\% \pm 21,4$  control vs.  $28,6\% \pm 22,3$  tratamiento ( $P=0.025$ ) e integridad de membrana ( $18.3\% \pm 10,4$  control vs.  $13.6\% \pm 5,8$  tratamiento) ( $P=0.282$ ). En conclusión, los espermatozoides epididimarios expuestos al medio Lactosa EDTA plasma seminal incrementan su motilidad, conservando la morfofisiología en el post congelamiento.

## ABSTRACT

The purpose of this investigation was to evaluate the effect of the seminal plasma addition in Lactose EDTA medium used in cryopreservation of epididymal sperm in stallion. For it, the samples were evaluated at 2 moments: pre and post freezing. In post thawing 2 evaluations were made one that took as control for the samples that conserve the seminal plasma, and treatment for centrifuged samples and in consequence the seminal plasma was eliminated.

In control group, the seminal plasma presence, was demonstrate in low percentage of motility ( $8,75\% \pm 5.2$  control versus  $2.5\% \pm 2.6$  treatment), exist significant differences between both groups ( $P=0.006$ ). Nevertheless, significant differences in vitality ( $9,1\%$  were not demonstrated  $\pm 5.3$  control versus  $12.5\% \pm 10.5$  treatment) ( $P=0.339$ ); in morphology: abnormalities of head  $12,6\% \pm 6.2$  control versus  $8,6\% \pm 3.2$  treatment; abnormality of neck  $5.5\% \pm 2.3$  control vs,  $7.6\% \pm 4.5$  treatment, abnormality of tail  $46.6\% \pm 21.4$  control versus  $28,6\% \pm 22.3$  treatment) and membrane integrity ( $18,3\% \pm 10.4$  control versus  $13.6\% \pm 5.8$  treatment) ( $P=0.282$ ). In conclusion, the exposure of epididymal sperm in stallions to Lactose EDTA-seminal plasma increase their motility, conserving their morfophysiology in post thawing.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	6
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	7
I. INTRODUCCION .....	8
II. ANTECEDENTES .....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1. Colecta de Espermatozoides .....	23
3.2. Evaluación espermática pre-congelamiento .....	23
3.2.1. Análisis Cualitativo.....	23
3.2.2. Análisis Cuantitativo: Concentración Espermática.....	24
3.3. Criopreservación.....	25
3.4. Descongelamiento y Evaluación espermática.....	25
IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
V. RESULTADOS.....	27
VI. DISCUSION .....	29
VII. CONCLUSIONES .....	33
VIII. RECOMENDACIONES .....	34
IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35
X. ANEXOS .....	41
10.1. ANEXO I.....	41
10.2. ANEXO II. ....	47
10.2.1. MEDIO LACTOSA- EDTA.....	47
10.2.2. MEDIO LACTOSA- EDTA – PLASMA SEMINAL .....	47
10.2.3. SOLUCIÓN HIPOSMÓTICA PARA REACCIÓN HOS.....	47

# INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Tabla 1. Porcentajes medios de los parámetros analizados en la etapa de pre congelamiento.</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 2. Porcentajes medios de los parámetros analizados en la etapa de post congelamiento, según grupos.</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 3. Concentración de espermatozoides en millones (1:100)</b>	<b>28</b>
Foto 1. Testículo y Epidídimo de potro	41
Foto 2. Epidídimo de potro: Cola (C) y Conducto Deferente (CD)	41
Foto 3. Técnica de Lavado Retrógrado para coleccionar espermatozoides epididimarios.	42
Foto 4. Vitalidad Pre Congelamiento	42
Foto 5. Morfología Pre Congelamiento. Anormalidades de Cabeza <sup>a</sup> , Cuello <sup>b</sup> y Cola <sup>c</sup>	43
Foto 6. HOS Pre Congelamiento	43
Foto 7. Vitalidad Post Congelamiento Control <sup>a</sup> y Tratamiento <sup>b</sup> .	44
Foto 8. Morfología Post Congelamiento Control. Anormalidades de Cabeza <sup>a</sup> , Cuello <sup>b</sup> y Cola <sup>c</sup>	44
Foto 9. Morfología Post Congelamiento Tratamiento. Anormalidades de Cabeza <sup>a</sup> , Cuello <sup>b</sup> y Cola <sup>c</sup>	45
Foto 10. HOS Post Congelamiento Control <sup>a</sup> y Tratamiento <sup>b</sup> .	46

# I. INTRODUCCION

La biotecnología reproductiva comprende una serie de biotécnicas que están permitiendo aumentar la eficiencia reproductiva y las tasas de mejoramiento genético de los animales, contribuyendo de esta forma a desarrollar la producción del sector ganadero, conservar las especies en peligro de extinción, incrementar favorablemente la multiplicación y transporte de material genético así como almacenar recursos genéticos únicos que puedan disponerse con relativa facilidad para su posible utilización futura.

En equinos, al igual que en otras especies, se utilizan actualmente como biotecnologías reproductivas, inseminación artificial, maduración *in vitro* de ovocitos, fecundación *in vitro*, ICSI (inyección intracitoplasmática) y transferencia de embriones para el manejo de los sementales con alto valor económico y mejorar la producción de sus animales élites en los criaderos.

Sin embargo, existen casos en los cuales el semental no puede cumplir con su función reproductiva ya sea por enfermedad, muerte súbita o si su especie está en peligro de extinción, por ello, es importante establecer un método alternativo que permita conservar sus espermatozoides, de modo que se logre descendencia, la obtención de espermatozoides a partir de epidídimos mediante el lavado retrógrado, nos permite colectar espermatozoides potencialmente viables para programas de mejoramiento y o producción de embriones *in vivo* o *in vitro*.

En el Perú, las investigaciones realizadas en espermatozoides epididimarios de potros, son escasas, por lo cual, se trabaja en base a la modificación de protocolos de criopreservación (cuyas muestras son eyaculados), con la finalidad de minimizar el daño post congelamiento e incrementar las tasas bajas de motilidad pre y post congelación, mejorando la calidad y viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, existe un factor poco estudiado como es el plasma seminal (más aún si se trata de espermatozoides epididimarios), el cual, *in vivo* forma parte fundamental de la producción de semen,



pero que *in vitro* presenta resultados muy contradictorios en los trabajos realizados. El siguiente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del medio Lactosa EDTA - Plasma seminal en espermatozoides epididimarios criopreservados de potros con el fin de conservar su genética post-mortem.

## II. ANTECEDENTES

### FISIOLOGÍA TESTICULAR

En mamíferos, el funcionamiento fisiológico reproductivo se basa en el eje Hipotálamo-Hipófisis- Gónadas, el cual al llegar a la etapa de madurez sexual (6 años en potros), origina señales que actúan sobre el hipotálamo, activando a las GnRH (Hormonas gonadotrofinas) y estimulando a la hipófisis anterior, de modo que se libere LH (Hormona Luteinizante) y FSH (Folículo estimulante). La Hormona Luteinizante (LH) estimula a las células intersticiales para la producción de testosterona. La Testosterona y la FSH estimulan a las células de Sertoli y espermatogonias dando origen a la espermatogénesis. La testosterona, inhibina y otras sustancias, inhiben la liberación de FSH y LH, formando un sistema de retroalimentación negativa que mantiene la velocidad de la espermatogénesis y la concentración de testosterona en la sangre casi constante (+ estimula, - inhibe).

En potros, los túbulos seminíferos, se unen a través de los tejidos finos intersticiales e intervienen directamente en la producción, la maduración y el transporte de los espermatozoides mediante el epidídimo.

Para mantener la concentración apropiada de FSH, se produce activina que indica que los niveles de FSH son altos y la inhibina para inducir la producción de FSH. La testosterona, como todos los esteroides, puede pasar libremente a través de las barreras celulares y en las células de Sertoli. Sin embargo, para asegurar una alta concentración de testosterona dentro del tubo seminífero, las células de sertoli producen una molécula especializada llamada la proteína obligatoria del andrógeno (ABP) que se encarga de mantener los niveles de testosterona y su disponibilidad. (Day. 1999).

El epidídimo se divide en tres regiones funcionales; cabeza (cabeza), pieza media (cuerpo) y cauda (cola), donde los espermatozoides experimentan la maduración fisiológica y funcional (Bedford. 1970). La maduración implica una serie de cambios

morfológicos, bioquímicos, biofísicos, y metabólicos. Fisiológicamente, los espermatozoides desarrollan su motilidad mientras que atraviesan el epidídimo. Hay una correlación entre la cantidad de calcio libre que rodea los espermatozoides dentro de los epidídimos de la cauda y los niveles dados de motilidad (Morton y col. 1978). El cambio morfológico más importante es la pérdida de la forma citoplásmica. Metabólicamente, los espermatozoides llegan a ser más activos y demuestran pérdida de azúcares. Otros cambios asociados a la maduración son la modificación del complejo DNA-proteína del núcleo para reducir al mínimo la probabilidad de daño ambiental o de degradación prematura, la modificación de la membrana plasmática, mitocondria, y componentes fibrosos y microtubulares de los pedazos medios y principales que permiten la transducción de la energía en la motilidad, la estabilización del plasma y de las membranas del acrosoma y desarrollo de las proteínas y receptores de unión al ovocito.

El semen de potro se produce en el rete testis, epidídimo, y glándulas accesorias. La composición química del plasma seminal varía según el aporte de cada una de estas estructuras, lo que contribuye al desarrollo y maduración de los espermatozoides. Sin embargo, trabajos realizados en plasma seminal han demostrado ser perjudiciales, ocasionando daños en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento a largo plazo, por lo que se le retira al momento de efectuar la criopreservación. Por otro lado, hay evidencias que el plasma seminal puede desempeñar un papel importante en el tracto reproductor femenino, ya que además de ser un vehículo para los espermatozoides, ha demostrado tener influencia positiva en la fertilidad (Troedsson y col. 1995).

El plasma seminal tiene un efecto represivo en la activación del complemento, PMN-chemotaxis y fagocitosis. El plasma, al ser eliminado de manera parcial en los procesos de criopreservación, puede ocasionar que la duración de la inflamación uterina sea menor en comparación a cuando se le retira totalmente y se le sustituye por un dilutor o suplemento (Troedsson y col. 2001).

Según Troedson y col. (2002), la fertilidad también se ve afectada si se elimina o adiciona plasma seminal ya que los niveles descienden si se le elimina parcial o totalmente, mientras que si se adiciona plasma los niveles se tornan normales.

## EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

El análisis de semen tiene gran importancia en el diagnóstico de la capacidad fecundante del espermatozoide en un eyaculado. Ello deriva en un diagnóstico que de ser desfavorable, plantearía no sólo el tratamiento a seguir, sino que también el descarte del animal como reproductor. (Caiza de la Cueva. 1998).

Usualmente, el análisis seminal provee la primera señal de un factor masculino de infertilidad, por ello, incluyen una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática.

Un espermatograma se inicia con el análisis de las características macroscópicas que comprenden fundamentalmente al volumen, color, pH. Posteriormente, se inicia el estudio microscópico, mediante el cual se estudian en forma cuantitativa y cualitativa a los espermatozoides, verificando la motilidad, vitalidad, integridad de membrana, morfología, concentración, la aglutinación (cuando están vivos, unidos entre sí) o la agregación (cuando están probablemente muertos, unidos a otras células, entre ellos y la existencia de otras células, como leucocitos (por medio de coloraciones de peroxidasa, tipo benzidina-cianosina o azul de Toluidina) (Mortimer. 1994).

La valoración bioquímica del semen refleja los productos de la secreción de las glándulas accesorias, las que juegan un rol importante en la determinación de la presencia o ausencia de infección o disfunción de una glándula en particular. Entre todos los parámetros cuantificables destaca la medición de la fructosa, un marcador de la función de las vesículas seminales que es muy útil para distinguir entre los casos de azoospermia obstructiva o secretora, porque los niveles bajos de fructosa se observan cuando la azoospermia es obstructiva. Por otra parte, se han cuantificado menores

niveles de L-carnitina (total y libre) y zinc, estadísticamente significativos, en plasma seminal en hombres infértiles respecto a varones fértiles (Mortimer. 1994).

Existen otras pruebas funcionales espermáticas que permiten obtener una idea acerca de la capacidad fecundante del espermatozoide. Entre las que evalúan la capacidad de transporte están: la prueba de interacción moco-semen *in vivo* (prueba poscoital) o la de interacción moco-semen *in vitro* (la prueba de Kremer, la de Miller-Kurzrok o la que emplea moco-semen cruzados). Por otra parte, existen otras pruebas que miden la habilidad fertilizante, tales como la monitorización de glicoproteínas espermáticas (por acción de lectinas) durante el proceso de capacitación, la prueba de hinchazón hiposmótica para valorar la funcionalidad de la membrana plasmática, la evaluación acrosomal (por medio de tinciones diferenciales, anticuerpos monoclonales, inmunofluorescencia o microscopia electrónica), el ensayo de unión a la zona pelúcida en hemizona (para comparar los espermatozoides del paciente con controles), y la penetración de ovocitos de hámster a los que se ha removido la zona pelúcida. Las pruebas de unión a zona pelúcida y de penetración del espermatozoide al ovocito desnudo de hámster, son simplemente modelos experimentales que intentan predecir el comportamiento del espermatozoide en el momento de la fecundación; sin embargo, el alto porcentaje de falsos positivos así como la baja reproducibilidad entre diversos laboratorios han influido para desaconsejar su uso rutinario. (Mortimer. 1994).

## Motilidad

La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal.

Existen varias técnicas de estudio de la motilidad, pero la más simple y estudiada es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración todo el material debe estar temperado a 37°C.

Los espermatozoides presentan dos tipos de movimiento principal, que son el movimiento progresivo lineal o circular, o el movimiento de rotación (sobre su propio eje). Además, existe la denominada “motilidad masal” que se realiza únicamente en eyaculados de mamíferos que presentan elevadas concentraciones espermáticas, como en el caso de ovinos y vacunos; y consiste en colocar una gota de la muestra sin diluir en una lámina portaobjetos temperada, que luego es llevada al microscopio a un aumento de 400X, dándole como escala de numeración de 0 a 5 o de 0 a 100% según la preferencia del evaluador.

Para la motilidad individual, el estudio se realiza colocando una gota seminal diluída, entre una lámina portaobjetos y cubreobjetos que luego es llevada al microscopio a un aumento de 400X para analizar la motilidad total y la motilidad progresiva (en porcentaje). El resultado de estas valoraciones, será el índice de la calidad de movimiento que presenta la muestra seminal. (Quintero. 2003).

En el caso del trabajo en fluido con espermatozoides extraído directamente del epidídimo es imposible realizar el análisis de motilidad en una muestra sin diluir ya que la concentración de espermatozoides es altísima y no se pueden diferenciar los espermatozoides con facilidad (Amman. 1981).

## Morfología

La morfología de los espermatozoides se ha considerado como uno de los indicadores de la calidad, para lo cual se utilizan un número de métodos de evaluación y de sistemas de clasificación morfológicos.

Las características morfológicas del espermatozoide se pueden evaluar mediante tinciones, fijaciones en un medio salino adicionado con formol, entre otras. Entre las técnicas de tinción más utilizadas tenemos a la eosina/nigrosina (Dott. 1975), eosina-azul de anilina (Van der Schaaf. 1952), el Giemsa (Graham. 1996), etc. Las muestras no coloreadas, se pueden analizar usando microscopia de contraste de fases en una

ampliación de 1000X, mientras que, en el caso de muestras coloreadas, se analizan bajo microscopía convencional.

El sistema de clasificación varía entre laboratorios, en algunos casos, se clasifican los espermatozoides según el origen de las anormalidades (Bielanski. 1950). El origen de las anormalidades primarias se produce durante la espermatogénesis, y se dividen en subgrupos de anormalidades de cabeza, cuello y cola. Las anormalidades secundarias se ocurren en los conductos deferentes y pueden ser clasificados en anormalidades de la cabeza, del cuello y de cola.

Bloom (1973) simplificó la clasificación según su magnitud, los defectos importantes incluyen ciertos tipos de cabezas anormales, defectos en el acrosoma, cabezas anormales ó pérdida de ella, defectos de cuello, etc. Los defectos de menor importancia incluyen acrosomas separados, colas dobladas, entre otros. Nishikawa (1959) utilizó una clasificación más simple de anormalidades que incluye siete categorías básicas de anormalidades: cabeza, cuello y cola, duplicación de cualquiera de las piezas, aislamiento de la cabeza y de la cola, deficiencia de la cabeza y cola. Bretschneider (1948) clasificó las anormalidades en seis grupos: acrosoma, cabeza, cuello, colas anormales, duplicación en alguna de las partes y pérdida de cabeza o cola.

La evaluación de la morfología espermática provee información de la función testicular, así como, el potencial de fertilidad de un macho. Puede ser determinada por evaluación microscópica, en microscopio de contraste de fases o de transferencia. Para determinar que los espermatozoides de potro son normales deben cumplir con ciertas características como por ejemplo, cabeza, cuello y cola bien definidos. Mientras que para la determinación de anormalidades, se toman en cuenta, cabezas deformes, macrocéfalos, dobles cabezas, colas pequeñas, cuellos cortos, entre otros. (Amman. 1981)

## Integridad de Membrana (HOS)

Durante la prueba de HOS, los espermatozoides bioquímicamente activos, se someten a cambios de osmolaridad del medio en el que se encuentran, por ello, experimentan hinchazón de la cola y aumentan su volumen para establecer un equilibrio con su ambiente extracelular, ocasionando el enrollamiento del flagelo que se inicia en el extremo distal de la cola y procede hacia el cuello y la cabeza mientras que la presión osmótica del medio disminuye (Drevius y col. 1966; Juhasz,J y col. 2000).

Los medios hipoosmóticos contienen principalmente citrato de sodio y fructosa en proporciones iguales (Jeyendran y col. 1984), o fructosa, citrato de sodio, lactosa y sucrosa solamente (Neild y col. 1999). Los resultados de la prueba de HOS dan buena correlación con motilidad progresiva (Jeyendran y col.1984), ya que el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto está relacionado a la fertilidad de los espermatozoides congelados/descongelados, especialmente si han sido incubados a 37°C por 2 a 4 horas después de su evaluación.

## CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es el proceso físico-químico por el cual las células o tejidos son sometidos a bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C para detener la actividad enzimática intercelular, los procesos de respiración, crecimiento y multiplicación celular y metabolismo, es decir, todo tipo de actividad fisiológica celular.

Cuando el semen es congelado y sometido a muy bajas temperaturas, la tasa metabólica de los espermatozoides se detiene completamente, de esta manera es posible preservar el semen por un período largo, conservando en el tiempo los espermatozoides potencialmente fértiles y en consecuencia lo genes de un reproductor para su uso futuro (Maxwell. 1986).

Sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a la



variación de temperatura (congelamiento y descongelamiento) sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide. Por ello, se considera que el principal sitio de daño asociado a dichos cambios son las membranas espermáticas debido a la deshidratación a la que está expuesta la célula. (Watson.1995).

Existen dos técnicas de criopreservación de células: congelamiento estándar o congelamiento convencional (enfriamiento lento) y vitrificación. Aunque estos métodos son muy diferentes ambos pueden producir resultados exitosos en la criopreservación de las células. El éxito dependerá de la elección del método y dilutores adecuados. (Mellisho y col. 2006).

La congelación por enfriamiento lento involucra el uso de soluciones con baja concentración de crioprotectores (1 a 2 M) y bajas tasas de enfriamiento (0.1-1.0°C) con el uso de una máquina de congelamiento programable. Las células se deshidratan durante el proceso de enfriamiento. El daño celular durante este proceso puede ocurrir debido al shock osmótico, formación de cristales de hielo o toxicidad de los crioprotectores (Mellisho y col. 2006).

La formación de cristales de hielo en la célula, incrementarán la presión osmótica en el medio externo, con lo que se producirá el intercambio de agua, la variación de la concentración de sales intra y extracelular conforme se enfríe el agua, y el descenso de la temperatura propiciará la el desequilibrio proteínico. Así, los índices de congelación demasiado rápidos causan daño estructural por la formación de hielo intracelular. Los daños en la mayoría de las células ocurren principalmente, durante el proceso de congelamiento/descongelamiento. (Crabo. 2001).

El descongelamiento se debe hacer rápidamente para disminuir la posibilidad del daño intracelular por la producción de cristales de hielo. Un alto grado de sobrefusión generalmente se considera indeseado porque causará una fluctuación ascendente y hacia abajo rápida de la temperatura.

Crister y col. (1987) observaron que los espermatozoides de potro; descongelados, móviles y con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante

durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con los cambios semejantes a la capacitación, inducidos por los procesos de congelación en el espermatozoide.

Según Mazur (1972), diversos factores están implicados en las bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Afirma que, un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado y que la reducción de la fertilidad es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación, pues para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, mótils y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Por ello, los protocolos de congelación se van modificando y adaptando según los requerimientos de cada una de las especies, a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado, es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación, así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales.

#### DILUTORES: DILUCIONES Y CRIOPROTECTORES

El uso de crioprotectores es fundamental para la supervivencia de los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación. Su función es disminuir el punto de fusión de las soluciones, reducir la concentración intra y extracelular de solutos, evitar la excesiva deshidratación celular y la formación de hielo intracelular, y por ende, reducir el daño celular, además previenen la deshidratación total de la degeneración proteica causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el procesos de enfriamiento, y más aún no deben ser tóxicos de modo que se reduzca las probabilidades de daño celular.

Los crioprotectores se clasifican en permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares. Los intracelulares, son de bajo peso molecular, deshidratan la célula

penetrándola para proteger el citoplasma. Dentro de este grupo destacan el Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), Etilglicol (EG), entre otros.

Los crioprotectores extracelulares, son de alto peso molecular, actúan extrayendo el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar en la célula y preservan la funcionalidad y estructura de las membranas. Dentro de este grupo destacan la Glucosa, Fructosa, Sucrosa, Lactosa, Polivinilpirrolidona (PVP), entre otros.

### *Glicerol*

El glicerol es el principal crioprotector utilizado en criopreservación por su capacidad de penetración en la membrana., ya que reemplaza el agua en intracelular evitando así la desnaturalización. El glicerol fue utilizado inicialmente en concentraciones de 7-10%. En estos niveles, el glicerol era altamente tóxico hasta que Polge (1956) encontró que una concentración del glicerol entre 2-4% disminuía la fertilidad en cerdos. Posteriormente, se evidenció daños en el daño la membrana celular, utilizando glicerol en concentraciones sobre el 2%, pues se producía la pérdida de enzimas intracelulares.

En la actualidad, en los diferentes laboratorios, se trabaja con concentraciones que van del 2% al 2.5% de glicerol para el congelamiento de espermatozoides de potro. (Crabo. 2001).

### *Yema De Huevo*

La yema de huevo ha sido un ingrediente de muchos suplementos desde que su presencia fue demostrada para proteger a las células contra el shock osmótico, ya que su contenido de fosfolípidos interviene en la protección de la integridad de la membrana celular. (Crabo. 2001).

Cuando la temperatura desciende por debajo de la temperatura corporal, los lípidos experimentan transiciones de fase de un estado líquido a un estado en gel (forma rígida),

y la temperatura a la que esta transición se produce es dependiente de cada especie de lípido. Como resultado de estas transiciones, los lípidos pertenecientes a la misma especie se agregan en micro dominios, lo que provoca una alteración en las asociaciones normales de algunos de estos lípidos con proteínas de membrana y la formación de huecos o espacios en las membranas entre los dominios en fase gel y líquido (Amann. 1993).

El colesterol juega un papel muy importante en el control de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de las membranas, ya que proporciona una estructura estable en un amplio rango de temperaturas y permite la variación en la composición de los ácidos grasos, lo que influye en la fluidez de la membrana (Darin-Bennet y col. 1995). Los espermatozoides de las especies presentan diferente sensibilidad al shock térmico, dependiendo de sus ratios colesterol:fosfolípidos y cadenas de ácidos grasos poliinsaturadas:saturadas unidas a los fosfolípidos.

En general, los espermatozoides son resistentes al shock térmico cuando presentan un ratio colesterol:fosfolípidos elevado y un ratio de ácidos grasos poliinsaturados:saturados bajo. El ratio colesterol:fosfolípidos es un determinante importante de la fluidez y la estabilidad de las membranas a bajas temperaturas. Los espermatozoides de ciertas especies (humana y conejos) presentan un elevado ratio colesterol:fosfolípidos y estos espermatozoides son más resistentes al choque térmico que los espermatozoides de otras especies (ovino, equino, bovino, porcino) que presentan bajos ratios colesterol:fosfolípidos (Watson. 1981).

Existen otros suplementos que constituyen parte fundamental de los dilutores para el congelamiento, y que favorecen la productividad del semen, tales como los crioprotectores que forman parte de los dilutores necesarios para el congelamiento de los espermatozoides, y por consiguiente, la protección de la membrana lipídica, por ello, el congelamiento sin diluciones, sólo es posible en el caso de humanos.

En el caso de potros, los espermatozoides poseen una capa proteínica de origen seminal, que puede perderse fácilmente durante el proceso de capacitación, de ahí que algunos diluyentes incluyen proteínas de leche descremada en reemplazo, o en otros casos,

colocan el mismo plasma seminal, ya que es prácticamente imposible congelar el semen del semental sin eliminarlo del todo, como es el caso del semen de verraco. (Crabo. 2001).

Bruemmer y col (2002), demostraron que el 33% de espermatozoides epididimarios congelados/descongelados de potros, presentaron una baja en los parámetros de motilidad analizados en diferentes dilutores, mientras que el 11% presentó un aumento en la motilidad al ser congelado con el medio lactosa EDTA luego de ser descongelados.

En el caso de inseminaciones con semen fresco la inseminación se da de manera inmediata a la colecta, en los 5 minutos posteriores o luego de la dilución, a una temperatura de 37 °C, en la que se utiliza como dilutor leche descremada UHT. Esta técnica permite obtener dosis de IA de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totales, una fertilidad por ciclo del 53% en las razas de sangre (n=7756 ciclos). Este método, poco utilizado, da resultados igualmente satisfactorios (61% de fertilidad por ciclo, n=251). (Magistrini y col. 1999).

Cuando se utiliza semen refrigerado para la IA, este se conserva a 4 °C en leche semidescremada UHT adicionada con antibióticos cuando la duración de conservación es inferior a 12 h y en el medio INRA82 o el medio de Kenney cuando la conservación dura de 12 a 24 h. La dosis de IA es de  $200 \times 10^6$  espermatozoides totales. La fertilidad es entonces del 52% en las razas de sangre y del 50% en las razas de característica (n=2516 y n=6029 respectivamente). Cuando la conservación no excede 12 horas la IA es específica *in situ* y se dispone de pocos resultados fiables. En la mayoría de los laboratorios los medios de dilución son a base de leche y el medio más utilizado es Kenney (Kenney y col. 1975) con algunas alternativas que se refieren a la cantidad de antibióticos y sobre a aditivos (yema de huevo de huevo, azúcares, sustancias tampones, activadores de la movilidad, etc). La temperatura de conservación más utilizada es 4°C y se insemina a las yeguas con dosis que contienen de  $250$  a  $500 \times 10^6$  espermatozoides con motilidad progresiva, es decir, cuya trayectoria es rectilínea. Tal dosis corresponde alrededor  $700 \times 10^6$  a espermatozoides totales. No hay publicación de resultados de

fertilidad sobre un gran número de ciclos (Katila. 1997). En el caso de IA con semen congelado, la técnica de congelación utilizada actualmente en los laboratorios de los Haras, utilizan medios de dilución y congelación a base de INRA82, suplido respectivamente de 2% de yema de huevo y el 2,5% de glicerina. (Vidament. 1995). Este método permitió mejorar significativamente la motilidad de los espermatozoides a la descongelación así como la fertilidad.

Las últimas investigaciones en inseminación artificial con semen fresco utilizan una temperatura de 4°C generalmente como temperatura estándar de congelamiento. Sin embargo la refrigeración de los espermatozoides de 37°C a 4°C pone en juego reorganizaciones en sus membranas, las cuales se agrupan bajo el shock frío. Esto causa una serie de acontecimientos que consiguen la pérdida de la capacidad fecundante y muerte celular. Una de las consecuencias de este shock térmico es la oxidación de las membranas de los espermatozoides. Es posible limitar estas degradaciones de dos maneras: por la conservación de los espermatozoides a una temperatura más elevada o por la contribución de agentes antioxidantes en los medios de conservación. Con el fin de limitar los efectos dañinos de la pendiente de temperatura hasta 4°C, se realizaron algunos estudios sobre la conservación de los espermatozoides a temperaturas superiores.

En el caso de inseminaciones artificiales en las que se utilizaron espermatozoides obtenidos a partir de epididídimos, Barker (1954) reportó la primera preñez usando espermatozoides epididimarios congelados de toro. Sin embargo, el nacimiento del becerro no fue divulgado (en él, los espermatozoides fueron mezclados con un dilutor a base de leche descremada al cual se le adicionó glicerol al 10%.)

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Colecta de Espermatozoides**

Se colectaron un total de 12 testículos provenientes de potros beneficiados en el Camal del Equinos “CASA BLANCA” - Pachacámac, Lima. Los epidídimos fueron separados de los testículos y colocados en tubos cónicos para transportarlos al laboratorio. (Foto 1 y 2).

La recuperación de los espermatozoides se realizó mediante la técnica de lavado retrógrado de los conductos y vasos deferentes con 10 ml de diluyente lactosa EDTA (lactosa 11 gr, EDTA 0.1 gr, citrato de sodio 0.089 gr, bicarbonato de sodio 0.008 gr, yema de huevo 3%, glicerol 3.5%, agua destilada 100 ml) adicionado con plasma seminal (1:1). (Amann y col. 1982). (Foto 3).

### **3.2. Evaluación espermática pre-congelamiento**

#### **3.2.1. Análisis Cualitativo**

##### **3.2.1.1. Motilidad**

El porcentaje de motilidad fue determinado colocando una gota de la muestra diluída en el medio Lactosa EDTA – Plasma Seminal una lámina temperada a 37°C, para luego evaluar el porcentaje de motilidad total y porcentaje de motilidad progresiva. (Amann, 1981). (Foto 4)

### **3.2.1.2. Vitalidad**

El porcentaje de vitalidad espermática se determinó en base a la coloración de una alícuota de muestra con Eosina al 0.5%, haciendo un conteo (a 40X) de 100 espermatozoides. Se consideraron espermatozoides vivos a los no coloreados y muertos a los espermatozoides coloreados de rojo.

### **3.2.1.3. Morfología**

La morfología fue evaluada mediante un frotis teñido con eosina al 0.5% identificando los espermatozoides normales y anormales en un conteo de 200 células medidos en porcentaje. (Foto 5)

### **3.2.1.4. Integridad Funcional de la Membrana Plasmática - HOS**

Se colocó 10 ul de la muestra y se le agregó 1 ml de solución hiposmótica, (citrate de sodio 7.35 gr/l y fructosa 13.51 gr/, pH7.2) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se tomó una alícuota de la muestra y se procedió a hacer el conteo de 100 células en 4 campos diferentes.

Se consideró reacción positiva a los espermatozoides que presentaron la cola hinchada y enrollada. (Foto 6)

## **3.2.2. Análisis Cuantitativo: Concentración Espermática**

La cantidad de espermatozoides se determinó haciendo el conteo en el hemocitómetro o cámara de Neubauer en una dilución 1:100.



### **3.3. Criopreservación**

Posterior al análisis pre-congelamiento, las muestras fueron divididas en dos grupos:

#### *Control*

Concluidos los análisis, las muestras que contenían los espermatozoides en el medio lactosa EDTA – plasma seminal fueron colocados en pajillas de 0.5ml a una concentración de  $250 \times 10^6$  espermatozoides por ml, luego enfriados a 4°C por 2 horas (período de equilibrio) y puestos en vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos para finalmente ser sumergidos en nitrógeno líquido a -196°C y transferidos a un tanque para su almacenamiento.

#### *Tratamiento*

Al finalizar los análisis, las muestras que contenían los espermatozoides en el medio lactosa EDTA – plasma seminal fueron centrifugados a 1600 rpm por 15 minutos.

El pellet resultante se resuspendió, se empajilló ( $250 \times 10^6$  espermatozoides por ml), enfrió a 4°C por 2 horas (período de equilibrio) y fue puesto en vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos para finalmente ser sumergido en nitrógeno líquido a -196°C y transferido a un tanque para su almacenamiento

### **3.4. Descongelamiento y Evaluación espermática**

Las pajillas se descongelaron en Baño María a 37°C por 30 segundos y las muestras fueron evaluadas inmediatamente según los parámetros ya establecidos. (Fotos 7, 8, 9).

## IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS versión 15.0 para el análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de las muestras. Se eligió el método de ANOVA para la determinación y comparación de los porcentajes medios y las desviaciones Standard de cada uno de los parámetros que presentaban distribución normal (vitalidad, morfología e integridad de membrana); mientras que para la motilidad los datos fueron analizados mediante una prueba no paramétrica.

Para comparar el efecto del plasma seminal sobre cada uno de los parámetros entre los grupos control y tratamiento, se utilizó el Test *t*-Paired. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ .

## V. RESULTADOS

De las muestras analizadas en la etapa de pre congelamiento, el porcentaje medio que se observó en cada uno de los parámetros estudiados fue de 43% en Motilidad Total, 18% en Vitalidad, 33% en Anormalidades (de Cabeza, Cuello y Cola) y de 33% en HOS (Integridad de Membrana). Tabla 1.

En el post congelamiento, la presencia de plasma seminal en el grupo control, demuestra que a pesar del bajo porcentaje de espermatozoides móviles que se observaron ( $8.75\% \pm 5,2$  control vs.  $2.5\% \pm 2,6$  tratamiento), existen diferencias significativas entre ambos grupos ( $P=0.006$ ). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en vitalidad ( $9.1\% \pm 5,3$  control vs.  $12.5\% \pm 10,5$  tratamiento) ( $P=0.339$ ); en morfología: anormalidades de cabeza  $12.6\% \pm 6,2$  control vs.  $8,6\% \pm 3,2$  tratamiento; anormalidad de cuello  $5,5\% \pm 2,3$  control vs.  $7,6\% \pm 4,5$  tratamiento, anormalidad de cola  $46,6\% \pm 21,4$  control vs.  $28,6\% \pm 22,3$  tratamiento) e integridad de membrana ( $18.3\% \pm 10,4$  control vs.  $13.6\% \pm 5,8$  tratamiento) ( $P=0.282$ ). Tabla 2.

**Tabla 1. Porcentajes medios de los parámetros analizados en la etapa de pre congelamiento.**

Muestra	NºMuestra (N=12)	Parametros (%)					
		Mot.Total	Vitalidad	A.de Cabeza	A.de Cuello	A.de Cola	HOS
Pre Congelamiento	12	43,33±16,29	18,33±15,02	15±5,03	5.75±3.84	12,59±7,34	33,33±22,7

$P < 0.005$

**Tabla 2. Porcentajes medios de los parámetros analizados en la etapa de post congelamiento, según grupos.**

Muestra Post Congelamiento	N°Muestra (N=12)	Parametros (%)					
		Mot.Total	Vitalidad	A.de Cabeza	A.de Cuello	A.de Cola	HOS
Control	12	8.75 <sup>a</sup> ± 5,27	9.1 ± 5,3	12.6 <sup>c</sup> ± 6,2	5,5 <sup>d</sup> ± 2,3	46,6 <sup>e</sup> ± 21,4	18,3 <sup>f</sup> ± 10,4
Tratamiento	12	2.5 <sup>b</sup> ± 2,6	12.5 ± 10,5	8,6 <sup>c</sup> ± 3,2	7,6 <sup>d</sup> ± 4,5	28,6 <sup>e</sup> ± 22,3	13,1 <sup>f</sup> ± 5,8

a P = 0.006

b P=0.025

**Tabla 3. Concentración de espermatozoides en millones (1:100)**

Muestra	Concentración spz en millones
1	6216000000
2	4485000000
3	2310000000
4	3360000000
5	5220000000
6	1800000000
7	2212000000
8	1188000000
9	4590000000
10	2921000000
11	2732000000
12	3332000000

## VI. DISCUSION

Los epidídimos contienen gran cantidad de espermatozoides morfológicamente normales y viables, que pueden ser o muy antiguos debido a la falta de reproducción o muy jóvenes debido a que los potros son sometidos a montas muy seguidas, por lo tanto representan una fuente disponible de germoplasma luego de la muerte o castración. Desafortunadamente, esta motilidad es muy baja para realizar protocolos de inseminación. Esto se debe a la poca exposición a los *factores activadores* presentes en plasma seminal, o por la remoción de los factores que inductores presentes en secreciones epididimales.

En el siguiente estudio, los epidídimos utilizados fueron seleccionados minuciosamente pues por ser muestras provenientes de animales que presentan un amplio margen de edad (entre 2 y 10 años); y que son destinados al beneficio (no funcionales), debían ser morfológicamente normales, descartando así aquellas muestras que presentaron signos de vejez o enfermedad (testículos con pequeños o con deformaciones, membranas amarillentas, entre otros). Dado que la información sobre el origen y la alimentación de los animales no fueron proporcionados, se sugiere que las posibles enfermedades a las que han podido ser expuestas las muestras, afectaron en la capacidad reproductiva de los espermatozoides.

Según Braun y col. (1994) los espermatozoides expuestos a plasma seminal mejoran su motilidad. Sin embargo, el efecto del plasma seminal en la criopreservación es perjudicial para la supervivencia de los espermatozoides posterior a la criopreservación, por ello, el plasma seminal es eliminado mediante la centrifugación. Los resultados del presente trabajo sugieren que la exposición de los espermatozoides epididimarios al plasma seminal, incrementan la motilidad total post congelamiento (grupo control), sin afectar la vitalidad, morfología e integridad de membrana, comparado con lo demostrado por Stout y col. (1999) el cual afirma que el plasma seminal tiene un efecto notorio en la motilidad de los espermatozoides, ya que se incrementan levemente los

niveles de motilidad total después de haber sido sometidos a procesos de centrifugación y post congelamiento, sin afectar la morfología, la vitalidad ni la integridad de la membrana de los espermatozoides epididimarios, antes o después del proceso de criopreservación.

No obstante, cabe la posibilidad que dichas diferencias probablemente se deban en parte a que la valorización de ésta se realiza de manera subjetiva y que no sólo sea al efecto del medio lactosa EDTA-plasma seminal que permite mejor conservación de los espermatozoides ante el shock osmótico y cambios de temperatura que se presentan a lo largo de todo el proceso de congelamiento, esto debido a la acción de cada uno de sus componentes, tales como la yema de huevo que protege la membrana, la lactosa que interviene como fuente de energía, el EDTA y el bicarbonato que actúan como buffer, entre otros.

Todos los dilutores para criopreservación que se presentan en diferentes investigaciones se desarrollan según las necesidades de cada una de las especies para asegurar la calidad de los espermatozoides a lo largo del proceso de criopreservación, como es el caso de los medios a base de leche UHT, yema de huevo, Tris, etc.

Uno de los dilutores mas usados es el de Kenney (Katila 1997) que en un principio se utilizo para limitar la contaminación por contener una dosis de antibióticos en su composición. (Kenney y col.1995). Otro componente usado en la preparación de dilutores para criopreservación es la leche UHT semidescremada (por su contenido de lípidos) adicionada con penicilina y gentamicina. El éxito obtenido en las inseminaciones realizadas con el medio Kenney y dilutores a base de leche muestran que hay una similitud de un 41% y 49% para Kenney y leche descremada respectivamente. Batellier (1997), sin embargo, según Magistrini y col. (1992) afirmaron que la leche por ser un ingrediente que no tiene una composición química definida, se degrada rápidamente en un lapso de 8 horas de conservación.

Otro dilutor utilizado en los protocolos de criopreservación es en INRA 82, el cual en su composición presenta leche, gran cantidad de sales y en algunos casos se le adiciona yema de huevo. Dicho medio, conserva la motilidad después de 24 horas de

conservación sea a 4 o 15C. Por otro lado, esta el dilutor INRA 96, el cual en condiciones aerobias a 15C es significativamente superior a INRA 82 en condiciones anaerobias a 4C, además de tener un tiempo de acción por más de 72 horas a 15C.

Existen reportes que indican que después de 24 horas de conservación a 4C en anaerobiosis o a 15C en aerobiosis el INRA 96, el éxito de inseminaciones es igual al obtenido con Kenney. (Batellier 1997)

Investigaciones realizadas en gatos, indican que la morfología de los espermatozoides epididimarios pueden diferir de un eyaculado en un mismo individuo, esto puede deberse posiblemente a la exposición al plasma seminal al que son sometidos durante el proceso de eyaculación, por ello, los espermatozoides epididimarios son más resistentes al shock frío que los espermatozoides de un eyaculado (Axner y col. 1998).

Por otro lado, Harris y col. 1998 demostraron, que la motilidad y viabilidad de los espermatozoides epididimarios se mantiene en gran parte por la yema de huevo presente en el dilutor a comparación de otros medios que solo presentan leche o sales. Según Harrison y col. afirman que el medio lactosa EDTA, por su alto contenido de yema de huevo, aporta cantidad significativa de colesterol lo cual mejora la motilidad de los espermatozoides en el post congelamiento. En el siguiente estudio lo podemos corroborar con los datos obtenidos en el presente trabajo, que muestran que el medio lactosa EDTA adicionado con plasma seminal ejerce un efecto de tipo conservador a nivel de vitalidad y morfología (conservando la viabilidad), mientras que mejora la motilidad de los espermatozoides epididimarios en el post congelamiento.

En 1997, Batellier afirmó que la motilidad post congelamiento en muestras centrifugadas y resuspendidas en lactosa EDTA eran del 30%, sin embargo, Moore y col (1940) concluyeron que al adicionar diferentes concentración de plasma seminal mejoraba la motilidad de los espermatozoides en el post congelamiento con el medio lactosa-EDTA. Los resultados del presente trabajo, muestran que el medio lactosa EDTA-plasma seminal mejora la motilidad en el post congelamiento en el grupo que no ha sido sometido a centrifugación pues está demostrado que esta daña la morfología de los espermatozoides.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que las diferencias existentes en la etapa de pre y post congelamiento son significativas, a diferencia del post congelamiento cuyas diferencias no son significativas, por lo que el daño ocasionado por la criopreservación en la membrana plasmática de los espermatozoides se debe al proceso de centrifugación al que son sometidas las muestras, mas no por efectos del medio; razón por la cual, el medio lactosa EDTA- plasma seminal, a pesar de presentar una concentración elevada de fosfolípidos y colesterol presentes en la yema de huevo sólo mantiene la fluidez de las membranas fosfolipídicas y el ratio colesterol:fosfolípido, así como, protege los espermatozoides contra el shock térmico a través de las lipoproteínas incluidas en la fracción de baja densidad (LDF) de la superficie externa de la membrana, conservando además la motilidad por largos intervalos de tiempo. (Pukazhenthí y col. 1999).

Esto es afirmado por Cary y col. 2004, cuando dicen que sea cual fuere el método de recuperación espermática (electroeyaculación o lavado retrógrado) o la cantidad de plasma seminal adicionado en el medio, los cambios en la membrana no son significativos en el post congelamiento. Además, Matás y col. (2007) afirmaron que las diferencias en la motilidad de los espermatozoides antes y después de ser centrifugados son significativas ya que se conserva el número de espermatozoides mótiles, mientras que la membrana lipídica no se ve afectada por el proceso de centrifugación.



## VII. CONCLUSIONES

- Los espermatozoides expuestos al medio Lactosa EDTA plasma seminal incrementan su motilidad post congelamiento.
- El medio Lactosa EDTA Plasma Seminal conserva la morfofisiología de los espermatozoides epididimarios en el post congelamiento.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar más investigaciones en espermatozoides epididimarios a fin de optimizar las técnicas de trabajo en el laboratorio.
- Llevar un registro de los datos de origen, edad, nutrición y alimentación, así como de enfermedades, de cada uno de los animales que llegan al camal, a fin de determinar la influencia de dichos factores sobre la fertilidad.
- Realizar pruebas con diferentes dilutores de modo que se determine el mejor dilutor a utilizar en programas de criopreservación en espermatozoides epididimarios.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AMANN RP, HAMMERSTED R H. 1993 *In vitro* evaluation of sperm quality. An opinion. J. Andrology; 14:397-406.
2. AMANN RP, LOOMIS PR, SQUIRES EL AND PICKETT BW. 1983 *Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA'lactose eegg yolk and packaged in straws* J. Animal Science 56 (3): 687-93.
3. AMANN, R. P. 1982. Use of animals models for detecting specifics alterations in reproduction. Fundam. Appl. Toxicol 2: 13-26.
4. AMANN, R. P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. Journal of Andrology. 2: 37-58.
5. AXNÉR, E; STROM HOLST, B and LINDE-FORSBERG, C. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda of epididimys before and after electroejaculation and comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cats. Theriogenology 50, 973-979.
6. BARKER, C. 1954. Low temperature preservation of bovine epididymal spermatozoa. Can. J. Comp. Med. 18:390-393.
7. BATELLIER, F. 1997. Identification, Purification et mécanismes d'action contenus dans le lait, agissant sur les espermatozoides equins. Tesis para obtener el grado de Doctor. Université Francois Rabelais de Tours. U.F.R. Sciences et Techniques.
8. BRAUN, J; SAKAI, M; HOCHI, S and OGURI N. 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa bye cooling and freezing. Theriogenology 41; 809 – 818.

9. BEDFORD, J.M. 1970. Sperm Capacitacion and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.*2: 128-158.
10. BIELANSKI, W. 1975. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23: 19-24.
11. BIELANSKI, W. 1950. Characteristics of the semen of stallions. Macro- and microscopic investigations with estimation of fertility. *Mem. Acad. Pol. Sci.* 16: 1-58.
12. BLOOM, E. 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.* 25: 383-391.
13. BRETSCHEIDER, L.H. 1948. Een normetafel ten gebruike bij de morphologische beoordeling van stierensperma. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 73: 421-433.
14. BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, Z. and SQUIRES E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology.* 58: 405-407.
15. CAIZA DE LA CUEVA, F.I. 1997. Estudio sobre la resistencia al stress osmótico de espermatozoides porcinos y equinos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
16. CARY, J.A; MADILL, S; FARNSWORTH, K; HAYNA, J.T; DUOOS, L; AND FAHNING M.L. 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J.* 2004 January; 45(1): 35-41.
17. CRABO, B.G. 2001. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In *depth: reproduction—the use of frozen semen.* 47: 291-297.
18. CRISTER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.D.; ARNESON, B.W and BALL, G.D. 1987. Criopreservation of human spermatozoa: Post-thaw

- chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 47: 980-984.
19. DARIN-BENNET, A. and WHITE, I. 1995. Cholesterol and phospholipids content of mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold shock. *J. Reprod. Fert.* 43(2):383-384.
  20. DAY W. 1999. *Summary Of Stallion Reproductive Anatomy And Physiology.* Day Equine.
  21. DOTT, H.M. 1975. Morphology of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23: 41-46.
  22. DREVIUS, L.O. and ERIKSSON, H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp.Cel Res*, 42 : 136-156
  23. GRAHAM, J. 1996. Criopreservation in stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Ame*, 12: 131-147.
  24. HARRISON, K.E; WEEB, G.W and DEKAT, C.L. Affect of pyruvate and cholesterol on post thaw motility of frozen stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci. Col* 82. Suppl 1/ J.
  25. JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.J. and ZANEVELD, L.J.D. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod Fertility* 70: 219 – 228.
  26. JUHASZ, J.; NAGY, P.; KULCSAR, M. and HUSZENICZA. 2000. Methods for Semen and Endocrinological Evaluation of the Stallion: A Review. *Acta Vet, BRNO* 69; 247-259.
  27. KATILA, T. 1997. Procedures form handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 48: 1217-1227.

28. KENNEY, R.M.; EVENSON, D.P.; GARCIA, M.C. and LOVE C.1995. Relation between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biol. Reprod* 1: 647-653.
29. KUMI-DIAKA, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
30. MAGISTRINI, M. 1999. L'insémination artificielle chez les équins. *INRA Prod. Anim*, 12 (5), 331-352.
31. MAGISTRINI, M; COUTY, I; PALMER, E. (1992). Interaction between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. *Acta vet. scand. suppl.* 88 : 97-110.
32. MATAS, G; DECUADRO, G; MARTINEZ-MIRO,S; GADEA,J (2007). Evaluation of cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology* 67 1087-1091.
33. MAXWELL, W,C. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronized oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Animal Reproduction Sci.* 10: 309-316.
34. MAZUR, P.; LEIVO, S.P. and CHU, E.H.Y. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental cell research.* 71: 345-355.
35. MAZUR, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 168: 939-949.
36. MELLISHO, E. and RIVAS, V. 2006. Criopreservación de Semen Ovino. *Manual de Laboratorio: Criopreservación de gametos y embriones mamíferos.* Universidad Ricardo Palma 3-12.
37. MOORE, B.H; MAYER, D.T AND MCKENZIE, F.F (1940). Factors influencing motility and metabolism in ram semen. *Proc. Am. Soc. Animal Production.* 33 : 210

38. MORTIMER, D. 1994. Practical laboratory andrology. Oxford University Press.
39. MORTON, R and SCHOEB, T. R. 1978. Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 598-600
40. NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M. and AGÜERO, A. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 51: 721-727.
41. NISHIKAWA, Y. 1959. Studies on reproduction in horses. Jap. Racing Ass., Tokio.
42. POLGE, C. 1956. Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 68: 62 - 75.
43. PUKAZHENTHI, B; PELICAN, K; WILDT, D and HOWARD, J. 1999. Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol. Reprod.* 61,135-141.
44. QUINTERO, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis Doctoral. 156 pp. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
45. STOUT, T.A.E; MORRIS, L.H.A, LI X; AND ALLEN, W.R. 2003. The effect of seminal plasma on the motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. Monograph Series: Workshop Havemeyer Foundation Monograph Series N°1 – European Equine Gamete Group: 5-6.
46. TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S. and MATTISEN, J. 2002. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed environment. *Theriogenology* 58, 453-456.
47. TROEDSSON, M.H.T.; LOSETH, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B. and CRABO, B.G. 2001. Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 273-278.

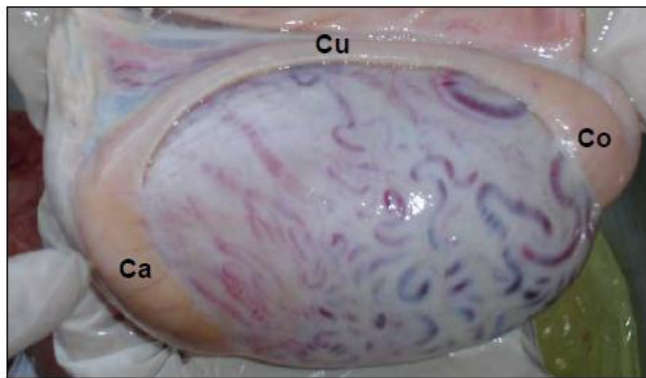
48. TROEDSSON, M.H.T.; LEE, C.S.; FRANKLIN, R.D and CRABO, B.G. 2000. The role of seminal plasma in postbreeding uterine inflammation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 56, 341-349.
49. TROEDSSON, M.H.T; STEIGER, B.N; IBRAHIM, N.M.; FOSTER, D.N. and CRABO, B.G. 1995. Mechanism of sperminduced endometritis in the mare. *Biol. Reprod.* 52, 91.
50. VAN DER SCHAAF, A. 1952. Vitalkleuring van stieren-sperma met een oplossing van anilineblauw en eosine. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 77: 815.
51. VÁSQUEZ, C. and GALLEGOS, C.A. Comparación Post-dilución de las características del caballo peruano de paso con tres dilutores comerciales. Universidad Nacional Agraria La Molina.
52. VIDAMENT, M. 1995. Endocrinologie de l'etalon. Monograph Series: Workshop Havemeyer Foundation Monograph Series N°6 – From Epididymis to Embryo: 345-347.
53. WATSON, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*: 7: 781-791.
54. WATSON, P.F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 1981; 62: 483-492.



## X. ANEXOS

### 10.1. ANEXO I

Foto 1. Testículo y Epidídimo de potro



Ca = Cabeza  
Cu = Cuello  
Co = Cola

Foto 2. Epidídimo de potro: Cola (C) y Conducto Deferente (CD)



Foto 3. Técnica de Lavado Retrógrado para coleccionar espermatozoides epididimarios.



Foto 4. Vitalidad Pre Congelamiento

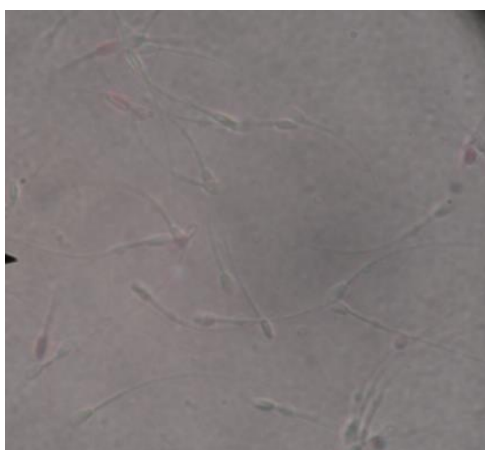


Foto 5. Morfología Pre Congelamiento. Anormalidades de Cabeza<sup>a</sup>, Cuello<sup>b</sup> y Cola<sup>c</sup>

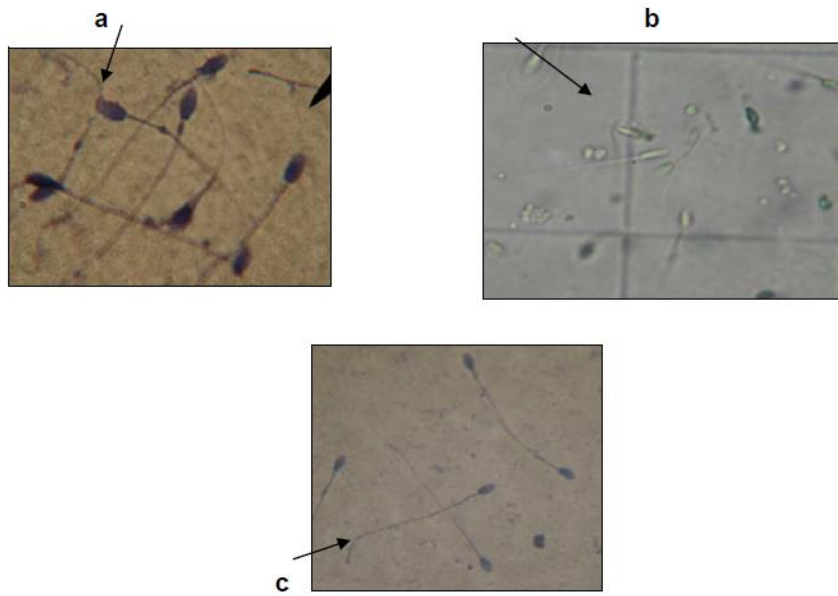


Foto 6. HOS Pre Congelamiento

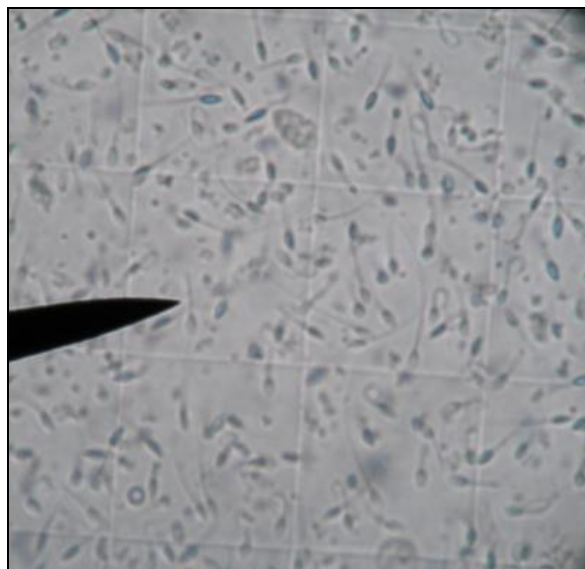


Foto 7. Vitalidad Post Congelamiento Control<sup>a</sup> y Tratamiento<sup>b</sup>.

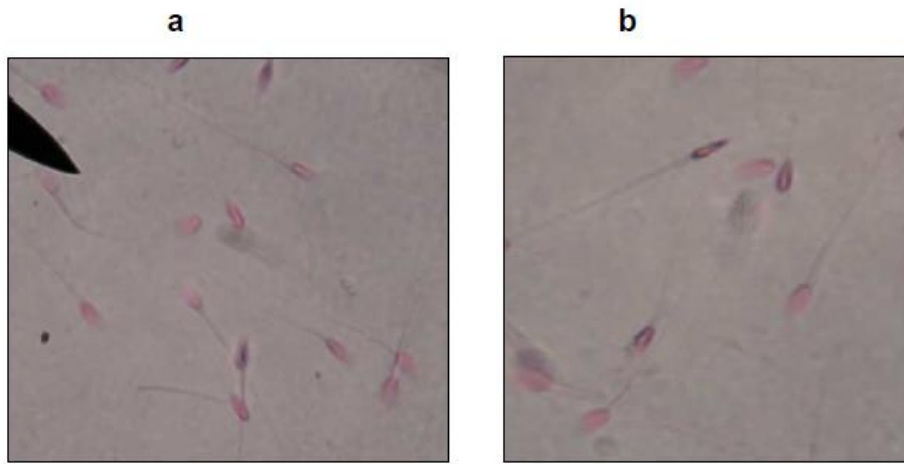


Foto 8. Morfología Post Congelamiento Control. Anormalidades de Cabeza<sup>a</sup>, Cuello<sup>b</sup> y Cola<sup>c</sup>

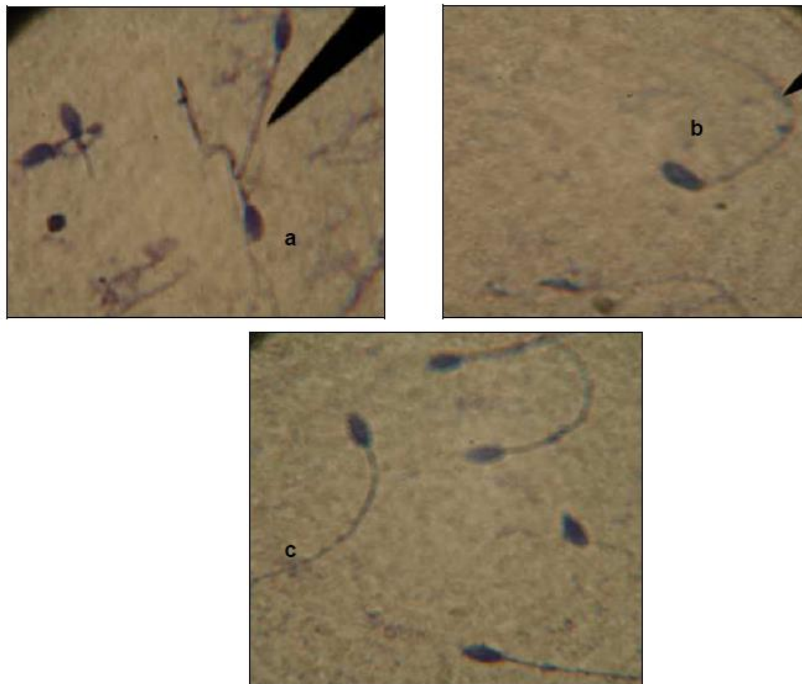


Foto 9. Morfología Post Congelamiento Tratamiento. Anormalidades de Cabeza<sup>a</sup>,  
Cuello<sup>b</sup> y Cola<sup>c</sup>

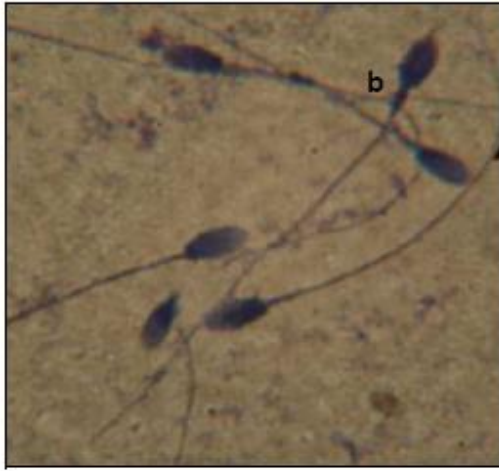
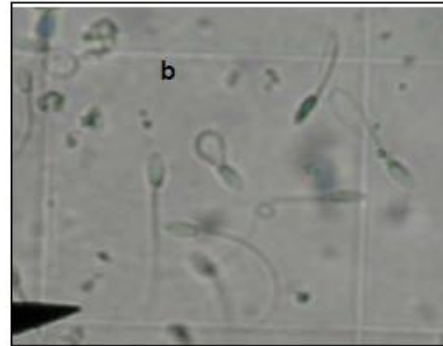
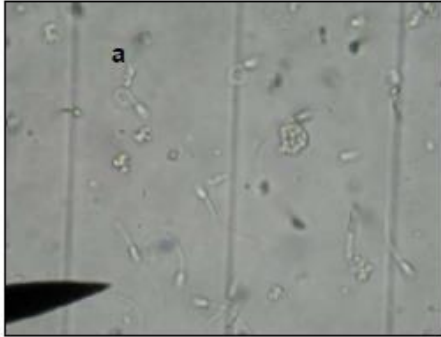


Foto 10. HOS Post Congelamiento Control <sup>a</sup> y Tratamiento <sup>b</sup>.



## **10.2. ANEXO II.**

### **10.2.1. MEDIO LACTOSA- EDTA**

Lactosa	11gr.
EDTA	0.1 gr
Citrato de Sodio	0.089gr
Bicarbonato de Sodio	0.008gr
Yema de Huevo	3%
Glicerol	3.5%
Agua Destilada	100 ml

### **10.2.2. MEDIO LACTOSA- EDTA – PLASMA SEMINAL**

Solución Lactosa-EDTA	50%
Plasma Seminal de Caballo	50%

### **10.2.3. SOLUCIÓN HIPOSMÓTICA PARA REACCIÓN HOS**

Citrato de Sodio	7.35 gr
Fructosa	13.51 gr
Agua Destilada	1000 ml
pH7.2	