



**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y AGRONOMÍA**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

# **Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos**

Trabajo de titulación para ser presentado  
como requisito para optar al título de  
Médico veterinario.

Profesor guía: Dr. Rodrigo Castro Sánchez  
Profesor corrector: Marie Claude Bastres

Constanza Javiera Elgueta Vera  
**SANTIAGO-CHILE**  
**2018**

## RESUMEN

Desde hace muchos años en las técnicas de reproducción asistida en medicina humana existen protocolos de procesamiento de semen para incrementar su calidad. En la industria reproductiva equina, las técnicas de semen artificial se han desarrollado ampliamente, aunque el uso de semen criopreservado es menor que en otras especies debido a problemas de supervivencia espermática y variabilidad individual. Esta variabilidad individual también ha sido establecida entre razas. En general, solo el 20-30% de los sementales producen un semen con buena capacidad de congelación, otro 40-60% aproximadamente con capacidad aceptable (aunque se ve afectado negativamente por la criopreservación) y otro 20-30% de sementales producen semen que no es congelable en absoluto. Estas limitaciones determinan que la inseminación artificial con semen congelado en équidos este menos extendida que en otras especies y encontrar sistemas y procedimientos adecuados para la refrigeración y/o congelación es una de las metas principales.

## **SUMMARY**

For many years in human assisted-reproduction procedures there have been special protocols to prepare and improve sperm quality. In the equine industry, artificial insemination techniques have been greatly developed, although cryopreserved semen is still less used comparing to other species due to spermatogenic survival problems and individual variability. This individual variability has also been established between breeds. In general, 20-30% of stallions are considered to have a good frozen-thawed sperm quality, 40-60% average frozen-thawed quality and the other 20-30% are not suitable for cryopreservation. All these limitations determine that artificial insemination with frozen semen in the equine is less widespread than in other species and finding systems and procedures to increase the number of stallions and ejaculates suitable to be cooled and cryopreserved is an important goal.

## Índice.

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	2
2.1. Criopreservación.....	2
2.2. Técnicas de criopreservación.....	3
2.2.1. Recolección de semen.....	3
2.2.2. Dilución y centrifugado.....	4
2.2.3. Adición del diluyente de congelación.....	5
2.2.3.1. Crioprotectores.....	5
2.2.3.1.1. Crioprotectores no permeables.....	5
2.2.3.1.2. Crioprotectores permeables.....	6
2.2.4. Refrigeración.....	6
2.2.5. Congelación y almacenamiento.....	7
2.2.5.1. Sistema convencional en Nitrógeno Líquido.....	7
2.2.5.2. Sistema Automatizado de congelamiento.....	7
2.2.6. Envasado.....	7
2.2.7. Descongelación del semen.....	7
2.3. Mecanismos de criolesión en el semen equino.....	8
2.3.1. Estrés Oxidativo.....	8
2.3.2. Estrés Osmótico.....	8
2.3.3. Estrés Térmico.....	9
2.3.4. Estrés Mecánico.....	9
2.4. Selección Espermiática.....	10
2.5. Áreas de mejoramiento.....	11
2.5.1. Uso de plasma seminal.....	11
2.5.2. Uso de Coenzima Q10.....	12
2.5.3. Uso de quelantes de calcio intracelular.....	12
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo generales.....	13
3.2. Objetivo específicos.....	13
4. Presentación de resultados y Discusión.....	14
4.1. Técnicas actuales de criopreservación.....	14

4.2. Principales puntos críticos en la criopreservación espermática.....	15
4.3. Principales áreas de mejoramiento de la criopreservación.....	16
5. Conclusión.....	18
6. Bibliografía.....	19

## 1. Introducción.

La criopreservación de semen es uno de los procedimientos más importantes en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida, y es utilizado en la inseminación artificial y la producción de embriones por metodologías *in vivo* e *in vitro*. Esta tecnología de conservación permite una máxima distribución y una adecuada disponibilidad de material germinal de especímenes de interés, facilitando el desarrollo de programas de mejoramiento genético para rasgos de valor comercial en la especie, a través de la selección o los cruces dirigidos. Sin embargo, la escasa fertilidad del semen equino criopreservado ha limitado de manera sustancial su utilización; esto es atribuible a la alteración de la fisiología normal y la viabilidad de los espermatozoides, que por la manipulación y procesamiento excesivos son sometidos a diferentes tipos de estrés.

Los espermatozoides de equinos son extremadamente sensibles a las alteraciones celulares generadas por la congelación, por el estrés osmótico resultante de la exposición a medios hipertónicos y por los cambios osmóticos inducidos durante el proceso. El estrés osmótico se ha asociado con efectos adversos sobre la motilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de las células espermáticas equinas, que podrían estar asociadas con el estrés oxidativo y es producido como resultado del incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) a causa del choque térmico y la naturaleza química de los crioprotectores utilizados; de la alteración de la disponibilidad y la funcionalidad de los antioxidantes endógenos a causa de la remoción del plasma seminal, y de la alteración estructural de los antioxidantes a causa de los efectos térmicos y tóxicos del proceso.

Debido a estos procesos es vital el mejoramiento de las técnicas de criopreservación de semen equino, con el fin de aumentar su eficacia y disminuir la mortalidad espermática. Por lo cual es necesario mantenerse actualizado en las nuevas investigaciones en torno a las técnicas y sus distintas áreas de trabajo para así obtener resultados exitosos en la industria.

## **2. Revisión Bibliográfica.**

### **2.1. Criopreservación**

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. Esto ha permitido poder almacenar células germinales de mamíferos por periodos largos de tiempo, incluyendo post-mortem, a través del uso de tanques criogénicos con nitrógeno líquido o en otros ambientes bajo cero (Meyers, 2012).

La inseminación artificial (IA) fue adoptada comercialmente a partir de los años 50, lo cual ha permitido a la industria ganadera hacer grandes progresos en la reproducción, pero debido a la variabilidad de las especies y la variabilidad entre individuo masculino, la inseminación artificial (IA) con semen congelado ha tenido menos éxito en ovinos, porcinos y cría de caballos (Meyers, 2012).

El semen equino criopreservado ha adquirido gran importancia en las últimas décadas, debido a los beneficios que ofrece su utilización. Entre éstos se destacan la posibilidad de almacenar el material genético de reproductores sobresalientes, distribuirlo internacionalmente, controlar enfermedades venéreas y aumentar la eficiencia del sistema de cría al posibilitar la inseminación de múltiples yeguas con un solo eyaculado. Sin embargo, la tasa de preñez disminuye cuando se insemína con semen congelado en comparación con la utilización de semen fresco o refrigerado. Esto sucede porque el proceso de congelación y descongelación es potencialmente dañino, e incluso letal, para los espermatozoides (Mesa y Henao, 2012).

El proceso de criopreservación tiene profundos efectos en las células, muchas de las cuales resultan en daño subletal, y la posterior reducción de la función. Muchos tipos de células no toleran el almacenamiento congelado en muy bajas temperaturas (menor a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), sometiéndose a un deterioro grave con daño letal. En presencia de crioconservantes con características de alta hidrosolubilidad y baja citotoxicidad que disminuyan el punto de cristalización de solventes (CPA), muchos tipos de células pueden sobrevivir al almacenamiento a bajas temperaturas. Como consecuencia del almacenamiento criogénico, aproximadamente el 25-75% de las células almacenadas se pierden debido a

la muerte celular necrótica y apoptótica, esto dependerá del tipo de célula, velocidad de congelación, y CPA (Meyers, 2012)

Los crioprotectores han sido ampliamente clasificados como penetrantes y sustancias no penetrantes. Penetrantes de CPA son moléculas pequeñas no iónicas (glicerol, dimetilsulfóxido, propilenglicol, etilenglicol, metilformamida) con alta solubilidad en agua, mientras que los no penetrantes de CPA son polímeros o azúcares (metilcelulosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa) de cadena larga. Uno de los orígenes más significativos de daño y muerte celular durante la congelación es el de intracelular y formación de hielo extracelular. Los crioprotectores actúan reduciendo la velocidad a la que se forma el hielo y el tamaño de los cristales. Con CPA adecuada, los daños de congelación pueden ser minimizados, pero altas concentraciones de la misma pueden causar daño celular (Ávila-Portillo et al., 2014).

## **2.2. Técnicas de criopreservación**

Todos los protocolos de congelación de semen equino requieren un procesado que incluye:

- ✓ Recolección de semen
- ✓ Dilución y centrifugación
- ✓ Adición del diluyente de congelación
- ✓ Refrigeración
- ✓ Envasado
- ✓ Congelación y almacenamiento
- ✓ Descongelación del semen

### **2.2.1. Recolección de semen**

Para la recolección de semen se debe realizar lavado del pene, principalmente en la fosa uretral, con el fin de eliminar microorganismos y smegma que se pueda encontrar en esa zona. Este proceso no debe alterar la flora bacteriana normal del pene por lo que el uso de soluciones bactericidas no son recomendadas (Alvarenga et al., 2016).

Tradicionalmente para la recolección se usan maniqués junto a vaginas artificiales que simulan a la yegua en celo (esta vagina artificial debe ser acondicionada con agua caliente para brindar un ambiente similar al natural y además puede o no ser lubricada con gel), esto brinda seguridad tanto para el animal como el operador encargado de la recolección de semen (Ávila-Portillo et al., 2014).

Otro método para llevar a cabo la recolección, el que consiste en que el animal está en estación sobre sus cuatro extremidades a través de masturbación que consiste en masajear con compresas atemperada a 45°C colocadas en el glande y en la base del pene hasta provocar la eyaculación. Este método se recomienda para animales que por problemas musculoesquelético no son capaces de realizar un buen servicio de monta (Alvarenga et al., 2016).

Existe un método llamado Excopula el que consiste en la utilización de fármacos para provocar eyaculación de los sementales, este método puede ser una alternativa a problemas como la falta de libido o problemas de erección. Se describe el uso de varios fármacos a fin de provocar la eyaculación excopula en equinos:

- ✓ Xilacina
- ✓ Clomipramida hydrochloride; en combinación con Xilacina
- ✓ Imipramina; en bajas dosis en equinos produce erección y masturbación
- ✓ Imipramina en combinación con Xilacina
- ✓ Detomidina
- ✓ Prostaglandinas
- ✓ HCG en combinación con prostaglandinas

Una vez decido el fármaco a utilizar se procede con la inyección, al poco tiempo de administrado (10-30 min.) se produce la protrusión del pene o erección; la eyaculación se produce inmediatamente después de la aplicación del fármaco (Serres Dalmus, 2015).

### **2.2.2. Dilución y centrifugación**

En los protocolos estándar de congelación de semen es necesario retirar la mayor parte de plasma seminal por centrifugación simple y resuspensión del pellet en diluyente de congelación con el objetivo de obtener espermatozoides concentrados. Se recomienda reducir el porcentaje de plasma seminal presente entre 5-20% ya que afecta de manera negativa la calidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Alvarenga et al., 2016).

El semen debe diluirse en leche descremada o en un diluyente a base de caseína. La dilución será en base a la concentración espermática, si es muy concentrada será de 2:1 ración (vol. / vol.) y como mínimo en ración de 1:1. El diluyente debe ser adicionado al semen con una temperatura de 37° C para evitar golpes de frío (González et al., 2015).

### **2.2.3. Adición del diluyente de congelación**

Tras la centrifugación se debe adicionar un diluyente de congelación adecuado según el procedimiento. Los diluyentes de congelación de semen están compuestos por diferentes sustancias como son crioprotectores, azúcares, antibióticos, electrolitos entre otros que cumplen las siguientes funciones: proveer nutrientes como fuente de energía, proteger a los espermatozoides de la bajada de temperatura y el procesado, mantener un adecuado equilibrio del pH, mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico e inhibir el crecimiento bacteriano (Alvarenga et al., 2016).

#### **2.2.3.1. Crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la máxima temperatura a la que se puede producirse la mayor cristalización del solvente y soluto. La disminución del mismo permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometido, es decir, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula queda más protegida (Ramónez et al, 2017).

##### **2.2.3.1.1. Crioprotectores no permeables**

Los crioprotectores no permeables son compuestos de elevado peso molecular que no atraviesan la membrana plasmática, por lo que su efecto protector lo desarrollan en el medio extracelular a través de mecanismos osmóticos favoreciendo un medio hipertónico que hace que salga agua de la célula (deshidratación), disminuyendo así la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Ramónez et al, 2017).

- ✓ Azúcares: De forma natural el plasma seminal presenta una serie de azúcares como lo son la glucosa, fructosa y sorbitol. De entre ellos la glucosa y la fructosa son los azúcares más empleados en los diluyentes de congelación de semen en animales, aunque el sorbitol se utiliza también para la criopreservación de semen en el toro y en el hombre. El uso de azúcares como la metilcelulosa no ha mostrado tan buen efecto crioprotector y siempre necesita combinación con otros crioprotectores (Ávila-Portillo et al., 2014).
- ✓ Leche Desnatada: las caseínas, fosfocaseínas y la beta lactoglobulinas procedentes de la leche son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al estrés por frío sirviendo la leche desnatada en polvo o entera homogeneizada

como constituyente básico del diluyente o formando parte en pequeñas cantidades de diluyentes sintéticos, aunque no está clara la naturaleza de su mecanismo crioprotector (Ramónez et al, 2017).

- ✓ Yema de huevo: los fosfolípidos y lipoproteínas procedentes de la yema de huevo son compuestos orgánicos que presentan una función protectora frente al daño desencadenado en la congelación. La yema de huevo que tradicionalmente se ha usado en los diluyentes de semen es de gallina, aunque también se ha probado de otras especies como pato con buenos resultados (Ávila-Portillo et al., 2014).

#### **2.2.3.1.2. Crioprotectores permeables**

Son compuestos de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana plasmática que producen una reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos de esta que hace incrementar su fluidez, favoreciendo la deshidratación celular a bajas temperaturas y disminuyendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación actuando tanto en el medio intracelular como extracelular (Ramónez et al, 2017).

- ✓ Glicerol: es el crioprotector más usado pero no existe uniformidad en cuanto a su concentración óptima en los diluyentes comerciales equinos, Presenta un claro efecto negativo pudiendo ser uno de los factores implicados en la baja motilidad y fertilidad post-descongelación que ha sido descrito en aves pero también en équidos. Su efecto tóxico causa alteraciones citoplasmáticas, además de provocar desnaturalización de proteínas. El principal efecto tóxico del glicerol parece estar desencadenado por el estrés osmótico producido durante su incorporación y eliminación en las fases de congelación y descongelación, por lo que se ha propuesto el uso de crioprotectores alternativos permeables de menor peso molecular y viscosidad y mayor permeabilidad que desencadenan un menor estrés osmótico y una menor formación de cristales de hielo intracelulares (Ávila-Portillo et al., 2014).

#### **2.2.4. Refrigeración**

En una gran mayoría de los casos es necesaria una fase de refrigeración y equilibrado de las células espermáticas en el diluyente de congelación, esto permitirá cierta deshidratación y estabilización de las células espermáticas, dependiendo de las diferencias de permeabilidad y peso molecular de los crioprotectores respecto a las soluciones fisiológicas.

En cualquier caso, tanto las tasas de equilibrado y refrigeración como las de congelación deben adaptarse a la composición del medio de congelación utilizado para optimizar los resultados (González et al., 2015).

## **2.2.5. Congelación y almacenamiento**

### **2.2.5.1. Sistema convencional en Nitrógeno Líquido**

El sistema convencional recomienda disponer las pajuelas horizontalmente 3-6 cms por encima del nivel de nitrógeno durante 7-20 minutos, habiendo una variación en el ritmo de congelación según la altura a la que se coloquen, aunque generalmente la velocidad es alta y de alrededor de  $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Este sistema presenta ventajas de ser económico, sencillo y requerir un menor coste de equipamiento y de gasto de nitrógeno líquido (Restrepo et al, 2012).

### **2.2.5.2. Sistema Automatizado de congelación**

Existen sistemas automatizados de congelación y en este caso normalmente se usan curvas de congelación que combinan varias velocidades, de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre los  $20^{\circ}\text{C}$  y los  $-15^{\circ}\text{C}$  y una segunda velocidad entre los  $-15^{\circ}\text{C}$  y los  $-120^{\circ}\text{C}$  de unos  $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para luego sumergir las pajuelas en nitrógeno líquido. En este sistema la tasa de congelación es más uniforme al tener un mayor control de la temperatura lo que se ha relacionado con una mayor calidad seminal post-descongelación respecto a la congelación con el sistema convencional (Restrepo et al, 2012).

## **2.2.6. Envasado**

El envasado se puede realizar en macropajuelas de 4 o 5ml, en micropajuelas de 1ml, en pajuelas de 0,5ml que es lo más frecuente o en pajuelas de 0,25ml. El enfriamiento es más uniforme y eficiente en las micropajuelas, principalmente en las de 0,5ml para semen equino, aunque se requieren varias pajuelas para completar la dosis de inseminación (Alvarenga et al., 2016).

## **2.2.7. Descongelación del semen**

Existen varios protocolos de descongelación de dosis seminales, pero en cualquier caso depende del sistema de envasado y de la velocidad de congelación. Normalmente se recomiendan protocolos de descongelación de las micropajuelas mediante inmersión en

agua a 37°C durante 0,5 o 1 minutos y para las macro pajuelas de 5 o 2,5ml se usan temperaturas de 50°C durante 45 segundos (Alvarenga et al., 2016).

## **2.3 Mecanismo de criolesión en el semen equino.**

La calidad del semen congelado-descongelado depende de la capacidad de los espermatozoides de resistir estos procedimientos sin perder sus funciones principales. La pérdida de una sola de sus funciones podría reducir o suprimir totalmente la fertilidad del espermatozoide. Durante los procesos de criopreservación se producen daños letales y subletales en los espermatozoides similares a la apoptosis que afectan a la viabilidad e integridad de los espermatozoides y por lo tanto a su vida media y capacidad fecundante. Los daños sufridos durante la criopreservación seminal han sido clasificados por varios autores según su origen en daños a los cambios de temperatura, de osmolaridad, o a la acción de agentes oxidantes (Alvarenga et al., 2016).

### **2.3.1. Estrés Oxidativo**

Durante el metabolismo oxidativo fisiológico de las células espermáticas se producen especies reactivas de oxígeno o “radicales libres” (EROs) que desempeñan un papel importante en la funcionalidad espermática de capacitación, reacción acrosómica y el mantenimiento de la capacidad fecundante entre otros. El problema se desencadena cuando se produce un desequilibrio en la producción o degradación de estas sustancias, lo que da lugar a la producción de efectos adversos sobre los espermatozoides que afectan a la membrana plasmática, el ADN o parámetros espermáticos como la motilidad (Tortolero et al., 2005).

Los espermatozoides equinos dañados o anormales que forman parte de la población heterogénea tras la descongelación generan mayor cantidad de EROs que los vivos o normales afectando negativamente a estos (Tortolero et al., 2005).

### **2.3.2. Estrés Osmótico**

Al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves (Fernández et al., 2009).

Los cristales de agua pura se comienzan a formar al bajar de  $-5^{\circ}\text{C}$ , y por el mismo fenómeno de cristalización todos los solutos quedan separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela. Este fenómeno lleva a un aumento en la presión osmótica, y al ser el agua dentro del espermatozoide más lenta en formar cristales que el agua fuera de este, ocurre una salida de agua al medio extracelular por gradiente osmótica, a través de la membrana plasmática. Como resultado de esto el espermatozoide se deshidrata (Fernández et al., 2009).

### **2.3.3. Estrés Térmico**

Durante el proceso de criopreservación se producen alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides que afectan a su viabilidad debido a los cambios bruscos de temperatura, afectándose principalmente la membrana plasmática y acrosomal (Aretio León, 2006).

El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con que esta ocurra. Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Aretio León, 2006).

### **2.3.4. Estrés Mecánico**

Los daños en las estructuras celulares del espermatozoide ayudarían a explicar el descenso de la movilidad y por ende de la fertilidad. Se ha reportado que los daños en la mitocondria están asociados a la disminución de la movilidad, pero también se ha encontrado que semen con alto grado de daños a nivel del ADN nuclear registra una marcada disminución de la movilidad y velocidad espermática post-descongelación (Alvarenga et al., 2016).

La viabilidad de las células, definida como las células con membrana plasmática intacta y función mitocondrial, han sido seleccionados como indicadores para la evaluación de la calidad espermática, especialmente para la crioconservación del espermatozoide, cuya membrana plasmática y mitocondrial pueden ser dañadas durante el proceso de crioconservación (Alvarenga et al., 2016).

## 2.4 Selección Espermática

Las técnicas de selección espermática seleccionan una subpoblación de espermatozoides según sus características, imitando en cierta medida los métodos de selección espermática naturales del tracto reproductivo de la yegua que tiene como objetivo permitir que solo los espermatozoides morfológicamente normales, con membranas intactas y cromatina espermática integra pasen a través del oviducto y fertilicen el ovocito.

Existen varios métodos de selección espermática:

- ✓ Técnica de Migración Espermática: Se basan en la habilidad de los espermatozoides motiles de moverse o migrar activamente hacia un medio selectivo de diferente composición al que se encuentran, los espermatozoides son seleccionados en base a su motilidad y no a su morfología, integridad y viabilidad. Esta técnica se aplica sobre pellet obtenido bajo centrifugación lo que afecta negativamente a la calidad resultante no solo por la técnica de centrifugación sino que en el pellet resultante los espermatozoides se concentran junto a detritus los que favorecen a la liberación de EROs (Sánchez et al, 2009).
- ✓ Técnica de Adherencia Espermática: Se basa en la mayor tendencia que presentan los espermatozoides muertos o dañados de adherirse a los gránulos de polisacáridos que forman los filtros, dejando que los espermatozoides con la membrana plasmática y acrosomal intactas pasen a través de las columnas de polisacáridos, incrementando por tanto la calidad de la muestra resultante. En quedos esta técnica se ha correlacionado con el aumento de la fertilidad (Sánchez et al, 2009).
- ✓ Técnica de Centrifugación Coloidal: Se utiliza una suspensión de partículas coloidales que se coloca en tubo de centrifugación formando un gradiente continuo o dos capas (una con un 40-45% de coloide y otra con un 80-90% de coloide). Sobre esta se coloca el semen y se procede a la centrifugación haciendo que los espermatozoides se separen en subpoblaciones con diferentes gravedades específicas de modo que los espermatozoides normales pasaran a través de estos gradientes y se situaran en el pellet en el fondo mientras que la mayoría de los espermatozoides no motiles o anormales, células germinales prematuras, otras células, plasma seminal y diluyente utilizado se quedaran entre los dos gradientes o sobre estos (Sánchez et al, 2009).

## 2.5. Áreas de mejoramiento

El auge de las técnicas de reproducción asistida en la medicina equina ha propiciado investigaciones que buscan la optimización de métodos para aumentar las tasas de fertilidad. Desde la criopreservación sigue dando bajos valores de viabilidad en los sementales, la manipulación y conservación de los espermatozoides es de vital importancia. Esta reducción de la fertilidad hace que sea esencial para los agricultores de encontrar nuevas opciones que garantizan la fiabilidad en el uso de estas técnicas (Mesa y Henao, 2012).

### 2.5.1. Uso de plasma seminal.

El plasma seminal (SP) es una compleja mezcla de proteínas sustancias no proteicas, tales como iones y sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que incluyen aminoácidos libres, monosacáridos, lípidos, poliaminas, prostaglandinas y hormonas esteroides. Uno de los componentes más importantes de SP son las proteínas que se unen a membranas de las células de esperma y están asociados con plena fertilidad. El efecto del SP en la criosupervivencia de los espermatozoides es discutible aún, ya que el proceso de centrifugación se semen en presencia de extensores no elimina todas las proteínas del SP, lo que hace difícil la interpretación de la adición de más plasma seminal (Al-Essawe et al., 2018).

Una forma de superar el problema de la propia SP estando presente los sementales es preparar las muestras de esperma por centrifugación coloide, como una sola capa de la centrifugación (SLC). Esta es una técnica valiosa para seleccionar buenos espermatozoides calidad, es decir, aquellos con buena morfología, viabilidad e integridad de la cromatina. Por lo tanto la combinación de SLC con la adición de pequeñas cantidades de SP de sementales de congelabilidad conocida podría ayudar a mejorar criosupervivencia de espermatozoides (Al-Essawe et al., 2018)

Para este proceso se deben seguir los siguientes pasos:

- ✓ Preparación del plasma seminal: El plasma seminal se obtiene de semen libre de gel fresco por centrifugación a 2000 × g durante 10 min. El sobrenadante se aspira en tubos estériles y se comprueba la presencia de espermatozoides; si se observan espermatozoides, las muestras se centrifugaron de nuevo a 3500 × g hasta que el SP queda libre de esperma.

- ✓ Concentración espermática: para establecer la concentración espermática se usa uno de los contadores celulares electrónicos como el Núcleo Counter SPR100®\_que permite obtener resultados. La concentración de la muestra restante se ajustó a  $100 \times 10^6$  espermatozoides / ml, y se utiliza para SLC con el coloide Equicoll. El sobrenadante y la mayor parte del coloide se descarta por aspiración cuidadosa usando una bomba de agua.
- ✓ Adición del plasma seminal: luego de establecer la concentración espermática se adiciona el plasma seminal de “buen congelador” para dar una proporción final de 5%.

### **2.5.2. Uso de Coenzina Q10**

La coenzima Q10 es un lípido redox capaz de promover la generación de energía a través de intercambio de electrones y protones en la cadena de transporte de electrones de interna membrana mitocondrial. También es un potente antioxidante presente en las lipoproteínas, capaz de prevenir la peroxidación de lípidos por inhibir la formación de hidroperóxidos. La coenzima Q10 ha demostrado mejorar la refrigeración de semen y la subfertilidad en el hombre mediante la prevención de la peroxidación lipídica y la promoción de la motilidad. Dado que el estrés oxidativo durante la crioconservación no se genera exclusivamente durante la congelación y descongelación, sino también durante la centrifugación, se evalúa la adición de diferentes concentraciones de la coenzima Q10 a partir de la centrifugación y los demás procesos de criopreservación (Carneiro et al., 2018)

### **2.5.3. Uso de quelantes de calcio intracelular**

La modulación del calcio intracelular es de suma importancia para la función celular normal. De interés, reducción de la calidad del semen durante la preservación se ha asociado con la interrupción de la homeostasis del calcio. En esperma, afluencia mitocondrial de calcio a través de los poros de transición de permeabilidad puede afectar la motilidad mediante la alteración de la conformación de la proteína motora miosina-VI y la supervivencia. La modulación de depósito de calcio intracelular parece estar asociada con la viabilidad y longevidad de los espermatozoides antes de la fertilización (Wu et al., 2018).

Funcionalidad de las mitocondrias en el esperma depende de contribución continua de la nicotinamida nucleótido de adenina (NADH) y redujo dinucleótido de flavina adenina (FAD) en la cadena de transporte de electrones, por lo tanto, la terminación de este mecanismo de generación de energía altera el potencial de membrana mitocondrial (MMP). Este es

probablemente el motivo para la inclusión de quelantes de calcio; estos atraparían calcio y disminuirían el gradiente de concentración en toda la membrana plasmática del espermatozoide. Las concentraciones de calcio 0,1 mM. Intracelulares son cuatro veces menores a las del ambiente exterior. Los quelantes actúan atrapado otros iones metálicos y podría también actuar inhibiendo la peroxidación de lípidos (Wu et al., 2018)

### **3. Objetivos.**

#### **3.1. Objetivos generales:**

Actualizar conceptos de mejoramiento en los protocolos de criopreservación espermática equina.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Reconocer las técnicas actuales de criopreservación.
- Identificar los principales puntos críticos en la criopreservación espermática.
- Reconocer las principales áreas de mejoramiento en la criopreservación.

## **4. Presentación de Resultados y discusión**

El material bibliográfico consultado corresponde a un total de 40 referencias. Sobre estas referencias se aplicó el siguiente método de inclusión y exclusión:

### **Criterios de inclusión:**

- Se incluye la información cuya temática tenga relación con los posibles mecanismos de criolesión espermática fundamentos básicos de criopreservación.
- Se incluyen las publicaciones realizar una actualización de los tópicos planteados en los objetivos de esta revisión bibliográfica.

### **Criterios de exclusión:**

- Se excluye la información de publicaciones que no concuerden con los objetivos planteados y especificados anteriormente.

Una vez aplicados los criterios de descritos anteriormente, dio como resultado la siguiente distribución de material bibliográfico, con 20 referencias:

Artículos de revistas científicas: 16

Libros: 1

Memorias de título: 3

### **4.1. Técnicas actuales de criopreservación**

Numerosos procedimientos han sido utilizados y estudiados para lograr congelar el semen equino de forma efectiva. A pesar de esto, las tasas de concepción logradas a partir del semen congelado en equinos siguen siendo mucho más bajas que las logradas con monta natural o inseminación artificial con semen fresco. Hasta el día de hoy existen ciertos impedimentos en el desarrollo de la industria equina de semen congelado:

1. Baja fertilidad con semen congelado en comparación con semen refrigerado.
2. Incremento en los costos asociados al manejo de yeguas para IA con semen congelado usando protocolos de inseminación actuales.
3. Muerte espermática durante el proceso de criopreservación.

A pesar de lo anterior son más los beneficios que brinda en la industria equina el semen congelado para el acceso a sementales:

1. Acortamiento de distancias entre países o continentes como también sementales de competencia
2. Evitar contraer o contagiar enfermedades infecciosas, heridas o con exceso de reservas durante la temporada de montas
3. Uso en el momento óptimo para la monta.

Las principales variables que afectan la congelación eficaz del semen están dadas por, la concentración espermática, el número total de espermatozoides vivos, motiles y morfológicamente normales, su habilidad para adaptarse a los cambios de condiciones osmóticas y su capacitación de una manera apropiada y en un tiempo adecuado, entre otras (Alvarenga et al., 2016).

Debido a las características del semen equino, numerosos procedimientos han sido utilizados y estudiados para lograr congelar de forma efectiva. A pesar de esto, las tasas de concepción logradas a partir del semen congelado de los caballos siguen siendo mucho más bajas que las logradas por medio de la monta natural o de la inseminación artificial con semen fresco, puesto que, el proceso de congelación y descongelación del semen equino presenta diversos problemas que incluyen la exposición del espermatozoide a la congelación, el daño producido por la formación de cristales y los cambios intracelulares debidos a la deshidratación asociada a la formación cristales intracelulares y procesos oxidativos que van en detrimento de la célula durante la congelación (Mesa y Henao, 2012).

## **4.2. Principales puntos críticos en la criopreservación espermática**

La crioconservación ocasiona daños en las células espermáticas por el estrés oxidativo, térmico, mecánico y osmótico ocasionado por la exposición a los crioprotectores y por el proceso de congelación y descongelación. La magnitud de los daños criogénicos, durante el proceso de crioconservación puede resultar en la disminución de la movilidad, velocidad espermática y capacidad fertilizante del semen crioconservado descongelado. La dilución del espermatozoides en las soluciones crioprotectoras así como las curvas de congelación y descongelación producen cambios en la célula espermática que deterioran su calidad (Tortolero et al., 2005)

Los cambios en la osmolaridad externa provocan daños en la estructura y funcionalidad celular, ya que generalmente el choque hiperosmótico induce alteraciones en el tamaño de las células. El daño celular cuando se utilizan tasas lentas de congelación se relaciona con la exposición y la eliminación de las condiciones hipertónicas ocasionada por los crioprotectores y considerando que un aumento en la tasa de congelación reduce al mínimo el tiempo de exposición del semen a los crioprotectores y por tanto se esperaría una disminución del daño ocasionado por el desequilibrio osmótico (Fernández et al., 2009).

### **4.3. Principales áreas de mejoramiento en la criopreservación**

Los avances biotecnológicos en los procesos de reproducción asistida, exigen la estandarización de diversos protocolos, entre ellos los de criopreservación de semen equino de ejemplares de alta genética, con el objeto de obtener material espermático disponible de manera sencilla y económica, para lo cual se hace necesaria una evaluación objetiva relacionada con las tasas de fertilidad in vivo y de ser posible una combinación de varias pruebas para permitir una mayor aproximación al potencial fertilizante del semen descongelado (Buitrago y Pérez, 2008).

El mantenimiento de la integridad del ADN durante la congelación es una de las cuestiones más importantes con el fin de lograr la preñez a través de la inseminación con espermatozoides. La aplicación de SLC antes de la criopreservación mejoraría la calidad del esperma, aunque este efecto no se vería mejorado por la inclusión de SP (Al-Essawe et al., (2018), a pesar de esto se requiere más investigación para estudiar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de SP a espermatozoides seleccionados. A través de la centrifugación coloide es posible eliminar las proteínas del SP lo que permite la adición de una cantidad conocida de SP para ser estudiadas y determinar el efecto en la criosupervivencia espermática (Usuga, Restrepo & Rojano, 2016).

De acuerdo al estudio realizado por Carneiro (2018) el uso de Coenzima Q10, un antioxidante, podría utilizarse para mejorar el semen equino. La Coenzima Q10 promovería la integridad de la membrana plasmática ya que esta inhibiría la formación de hidroperóxidos y por lo tanto la protección de la membrana plasmática frente a la oxidación. El uso de Coenzima Q10 sería más eficaz cuando es añadido al extensor usado en la centrifugación en lugar de usarlo junto al extensor de congelación, ya que es capaz de

compensar la deficiencia de antioxidantes en los sementales con mala capacidad de congelación.

La afluencia de calcio a través de la membrana plasmática a través de canales de calcio es un mecanismo de señalización que explota depósito extracelular ilimitado de este ion en condiciones fisiológicas. Ha sido bien conocido que criolesión infligido a la membrana plasmática de las células de esperma, altera la actividad de la edad Voltios y los canales de calcio-permeable de iones agonistas reguladas, alterando dramáticamente contenido de calcio intracelular. De manera subsiguiente, afluencia continua de calcio pone en peligro las mitocondrias por formación del poro de transición de permeabilidad y provocando de este modo la pérdida en la motilidad del esperma. La función de la célula se ve comprometida una vez que el potencial de membrana mitocondrial se pierde (Fernández et al., 2009).

El estudio de Wu (2018) demostró que la inclusión de un quelante de calcio ayuda a la refrigeración y de congelación-descongelación. El acrosoma, envoltura nuclear y las mitocondrias son los principales depósitos de calcio intracelular en los espermatozoides. El uso de quelantes podría ser utilizado como una herramienta para prolongar la vida útil de los espermatozoides en condiciones de almacenamiento refrigerado y para mejorar la congelación-descongelación.

## 5. Conclusión

1. Los cambios que sufren las células espermáticas en el proceso de criopreservación tienen efectos negativos sobre los diferentes parámetros espermáticos, 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.
2. Cuanto más agresivo es el tratamiento realizado previo a la congelación y re-congelación, menor es la calidad espermática.
3. La utilización de las técnicas de reproducción asistida es una realidad en cualquier sistema de producción equina de mediana a alta complejidad, aunque la técnica de criopreservación es una de las muchas técnicas empleadas, conllevan un costo considerable y requieren de investigación, es por ello que van dirigidas a una élite de individuos de alto valor genético, afectivo y para solucionar problemas de infertilidad puntuales.

## 6. Bibliografía

- 1) Alvarenga, MA; Ozanam Papa, F; Ramires Neto, C. 2016. Advances in Stallion Semen Cryopreservation (en línea). *Vet Clin Equine* 32(3): 521-530.
- 2) AL-Essawe, E., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., & Morrella, J. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*.
- 3) Aretio León, C. (2006). *EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES CANINOS CONGELADOS/DESCONGELADOS SOMETIDOS A DIFERENTES CONDICIONES DE CAPACITACIÓN IN VITRO* (Licenciatura). UNIVERSIDAD DE CHILE.
- 4) Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. and Reguero, M. (2014). FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, (Vol. 57 Núm. 4), pp.291-299.
- 5) BUITRAGO PEÑA, J., & PÉREZ SÁNCHEZ, L. (2008). *COMPARACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO* (licenciatura). UNIVERSIDAD DE LA SALLE.
- 6) Carneiro JAM, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA, Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability, *Animal Reproduction Science* (2018).
- 7) Essraa M AL-Essawe, Margareta Wallgren, Manuela Wulf, Christine Aurich, Beatriz Macias-Garcia, Ylva Sjunnesson, Jane M. Morrell, Seminal plasma influences the fertilizing potencial of cryopreserved stallion sperm cells, *Theriogenology* 2018
- 8) Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz de Assín, R., Zamora, S., Roldán, M., Rabelo, B., Ramírez, J., Yoldi, A. and Castilla, J. (2009). BASES OF SPERM CRYOBIOLOGY APPLIED FOR SPERM BANKS. *Revista Asebir*.
- 9) Gonzáles, M., Rodríguez, C., Oropeza, A., Wong, Y., Llanos, J. and Gonzáles, H. (2015). Uso del plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de equinos. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, [online] (Vol. 26, Núm. 2), p.352.

- 10) Gutiérrez Cepeda, L. 2014. Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Tesis doctoral. Madrid, ESPAÑA: Universidad Complutense de Madrid
- 11) Hafez, B; Hafez, ESE. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Trad. Feher de la Torre, G; Olvera Martínez, E. 7 ed. México, Mc Graw Hill. 519 p.
- 12) Mesa, A. and Henao, G. (2012). Effect of cholesterol and dimethyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm. Rev.MVZ Cordoba, [online] (Vol. 17 Núm. 1).
- 13) Meyers, S. (2012). Cryostorage and oxidative stress in mammalian spermatozoa. [ebook] Vancouver, Canadá, pp.85-95.
- 14) Ramónéz, J., Landívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez, D. (2017). *Effect of non-permeable cryoprotectants and commercial one on the physical characteristics of postfreeze bovine semen* [Ebook]. Ecuador.
- 15) Restrepo Betancur, G; Duque Cortés, JE; Montoya Páez, JD. 2012. Effect of two protocols of cryopreservation on fertilizing capacity of stallion (*Equus caballus*) SEMEN (en línea). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 65(2): 6711-6718.
- 16) Sánchez, I., Mar, C., Casilla, J., Marcos, M., Martín, I., & Galan, A. et al. (2009). *Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida* [Ebook] (4th ed.).
- 17) Serres Dalmus, C. (2015). MÉTODOS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, (5).
- 18) Tortolero, I., Arata-Bellabarba, G., Osuna, J., Gómez, R. and Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabismo*, (Vol. 3 N° 3).
- 19) Usuga, A., Restrepo, G., & Rojano, B. (2016). Cryotolerance of stallion semen, oxidative stability and components of seminal plasma. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, vol 27(n° 3).
- 20) Wu, S., Canisso, I., Yang, W., Ul Haq, I., Liu, Q., Han, Y., & Zeng, S. (2018). Intracellular calcium chelating agent (BAPTA-AM) aids stallion semen cooling and freezing–thawing. Wiley.

