



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y Recursos Naturales Renovables

Maestría en Reproducción Animal

**Evaluación de la dimetilacetamida como crioprotector de
espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con
percoll.**

AUTOR:

JORGE OSWALDO FERNANDEZ CAMPOVERDE

DIRECTORA:

Dra., Elena Carolina Serrano Recalde. PhD.

Loja-Ecuador

2022

Certificación

Loja, 22 de noviembre del 2022

Dra., Elena Carolina Serrano Recalde. PhD.

DIRECTORA DEL TRABAJO TITULACION

C E R T I F I C O:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Evaluación de la dimetilacetamida como crioprotector de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll**, previo a la obtención del título de **Magister en Reproducción Animal**, de la autoría del estudiante **Jorge Fernández Campoverde** , con **cédula de identidad** Nro 0302354337, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.

Dra., Elena Carolina Serrano Recalde. PhD.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACION

Autoría

Yo, Jorge Fernández Campoverde, declaro ser autor del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular o de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma: 

Cédula de identidad: 0302354337

Fecha: 22 de noviembre del 2022

Correo electrónico: jf038099@gmail.com

Teléfono:0984070885

Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total, y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Titulación.

Yo, Jorge Fernández Campoverde, declaro ser autor/a del Trabajo de Integración Curricular o de Titulación denominado: “Evaluación de la dimetilacetamida como crioprotector de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll”, como requisito para optar por el título de **Magister en Reproducción animal**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular o de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veinte y dos días del mes de noviembre del dos mil veintidós.

Firma: 

Autor: Jorge Oswaldo Fernández Campoverde

Cédula: 0302354337

Dirección: Biblián- Cañar-Ecuador

Correo electrónico: jf038099@hotmail.com

Teléfono: 0984070885

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del trabajo de Titulación: Dra., Elena Carolina Serrano Recalde. PhD.

Dedicatoria

Este trabajo de tesis dedico a Dios ya que él supo guiarme por un buen camino, darme fuerza para seguir adelante, también a enseñarme a encarar las adversidades que se presenta en el transcurso del camino.

A mi familia ya que gracias a ellos son quien soy, para mi esposa Nelly Patricia por su apoyo, consejos, comprensión, amor, y por toda su ayuda en todos los momentos ya que ella ha sido un pilar fundamental en mi vida.

En especial quiero dedicar a mis hijos Sebastián y Alejandro ya que ellos me dieron fuerzas para seguir adelante, fueron el motor principal para continuar adelante los quiero muchos hijos míos.

Para mis padres Luis Fernández, Ángeles Campoverde, también por su apoyo, ayuda en los momentos difíciles, por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han ayudado con todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi coraje para conseguir todos mis objetivos.

Gracias también a mis queridos colegas, que me supieron apoyar en todo en el trascurso de esta maestría

Agradecimiento

Mi muy sincero agradecimiento a mi tutora Carolina Serrano, por su valiosa tutoría en todo el proceso de realizar esta tesis compartiendo los hallazgos de esta investigación.

También agradecer a todas los docentes y todo el personal que conforma la Universidad Nacional de Loja, por darme una oportunidad y abrirme un camino y permitir que mi sueño se haga realidad.

Doctor Daniel Argudo no tengo palabras de agradecimiento para expresarle la gran ayuda que me ha brindado en ese tiempo de laboratorio, es un gran profesional le agradezco muchísimo

Índice General

1. Portada	I
Certificación	II
Autoría.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento	VI
Mi muy sincero agradecimiento a mi tutora Carolina Serrano, por su valiosa tutoría en todo el proceso de realizar esta tesis compartiendo los hallazgos de esta investigación.....	VI
También agradecer a todas los docentes y todo el personal que conforma la Universidad Nacional de Loja, por darme una oportunidad y abrirme un camino y permitir que mi sueño se haga realidad.	VI
Doctor Daniel Argudo no tengo palabras de agradecimiento para expresarle la gran ayuda que me a brindado en ese tiempo de laboratorio, es un gran profesional le agradezco muchísimo	VI
Índice General.....	VII
Índice de tablas:	¡Error! Marcador no definido.
3. Índice de tablas:	X
4. Índice de anexos:	¡Error! Marcador no definido.
1. Título.....	1
2. Resumen	2
2.1 Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Marco teórico	6

4.1	Métodos de recolección de semen	6
4.1.1	Vagina artificial	6
4.1.2	Electroejaculación	6
4.1.3	Masaje rectal	7
4.1.4	Recolección de semen del epidídimo	7
4.1.5	Recolección por flujo retrogrado:	7
4.1.6	Desmenuzamiento de la cola	8
4.1.7	Método mixto	8
4.2	Crioconservación de semen	8
4.2.1	Penetrantes o de acción intracelular	9
4.2.2	No penetrantes o de acción extracelular	9
4.3	Métodos de recuperación espermática del epidídimo	9
4.4	Fisiología espermática y espermatogénesis	10
4.5	Capacitación espermática.....	11
4.6	Evaluación de la función del espermatozoide por medio del sistema computarizo de análisis seminal (casa).....	11
4.6.1	Parámetros seminales “casa”	12
4.7	Crioconservación del semen	16
4.8	Crioprotectores.....	17
4.8.1	Crioprotectores penetrantes	17
4.8.2	Crioprotectores no penetrantes	18
4.9	PERCOLL.....	18
5.	Materiales y Metodología	19
5.1	Área de estudio	19
5.2	Procedimiento	20
5.2.1	Enfoque metodológico	20
5.2.2	Diseño de la investigación	20
5.2.3	Tipo de muestreo y tamaño de la muestra	20
	Variables independientes	23
5.	Resultados	24
	Discusión	26
6.	26	
7.	Conclusión	28
8.	Recomendaciones	29

9. Bibliografía.....	30
Anexos.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Identificación de los centroides.....	13
Figura 2. Recopilación de imágenes secuenciales del trayecto del espermatozoide.....	13
Figura 3. Variables cinemáticas de movilidad espermática medidas por los sistemas CASA	14
Figura 4. Clasificación según el tamaño del espermatozoide.....	14
Figura 5. Clasificación según la forma del espermatozoide.....	15
Figura 6. Clasificación según la pieza intermedia	15
Figura 7. Clasificación según el tamaño de acrosoma y vacuolas.....	16
Figura 8. Clasificación morfométrica del espermatozoide en el sistema CASA	16
Figura 9. Secuencia de eventos durante la separación de espermatozoides con el uso de dos capas de Percol.....	19
Figura 10. Mapa de la universidad católica de cuenca	19
Figura 11. Camal municipal de la ciudad de cuenca	20

Índice de tablas

Tabla 1. Media \pm error estándar de valores de espermiograma pós-descongelación de muestras extraídas de la cola del epidídimo de toros criopreservadas con diferentes protocolos	24
--	----

Índice de anexos

Anexo 2 transporte de muestras	36
Anexo 3 colocación del medio en el epidídimo	36
Anexo 4 colecta seminal epididimarios	37
Anexo 5 revisión del pull	37

1. Título.

Evaluación de la dimetilacetamida como crioprotector de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll.

2. Resumen

El avance de las Biotecnologías de la reproducción permite la conservación del material genético de diversas especies de interés comercial, en peligro de extinción, o que no pueden continuar con su proceso reproductivo fisiológico. El uso de crioprotectores adecuados permite la criopreservación seminal de forma exitosa. El objetivo del presente estudio fue evaluar la dimetilacetamida como crioprotector de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll. Se utilizaron 20 pares de epidídimos de toros, se obtuvieron los espermatozoides mediante el método de recolección por flujo retrógrado totalizando 7 pulls de muestras espermáticas. Cada pull se distribuyó en 4 tratamientos de crio preservación: Glicerol 6%, Glicerol 6% + centrifugación, Dimetilacetamida 6% y Dimetilacetamida 6% + centrifugación. En la centrifugación los espermatozoides fueron obtenidos mediante gradiente de densidad de Percoll al 90%. Se evaluaron la motilidad individual progresiva (%), viabilidad espermática (%), anomalías morfológicas espermáticas (%) e integridad de membrana espermática (HOECHST/PI %). Se observó un efecto del diluyente ($p < 0001$), pero no hubo alguna acción del centrifugado ($p \geq 0,05$). Al usar el diluyente Glicerol al 6% la motilidad individual progresiva ($60,59 \pm 2,94$) %, vitalidad espermática ($59,47 \pm 2,97$) % y la cantidad de células espermáticas con membrana íntegra HOECHST ($52,57 \pm 1,59$) fueron más elevadas en comparación con Dimetilacetamida 6%, ($39,88 \pm 2,94$; $23,71 \pm 2,97$; $34,73 \pm 1,59$) respectivamente. A su vez, existió una interacción ($p = 0,02$) entre el tipo de diluyente y la centrifugación sobre la vitalidad espermática, donde las muestras de Dimetilacetamida 6% centrifugadas presentaron mayor porcentaje de células vivas, que sin centrifugación. Se concluye que el uso de Dimetilacetamida al 6% como crioprotector es menos eficiente que el Glicerol al 6%, pero la centrifugación previa a la criopreservación seminal con Dimetilacetamida 6% favorece a la calidad espermática.

Palabras Claves: Epidídimo, Semen, análisis espermático, DMA, crioconservación

2.1 Abstract

The development of reproductive biotechnologies allows the conservation of the genetic material of various species either of commercial interest, in danger of extinction, or that cannot continue with their physiological reproductive process. The use of suitable cryoprotectors allows for successful seminal cryopreservation. This research paper is aimed to evaluate dimethylacetamide as a cryoprotector of bovine epididymal spermatozoa selected with percoll. We used 20 pairs of bull epididymides and the sperm were obtained using the retrograde flow collection method, totalling 7 pulls of sperm samples. Each pull was distributed in 4 cryopreservation treatments: Glycerol 6%, Glycerol 6% + centrifugation, Dimethylacetamide 6% and Dimethylacetamide 6% + centrifugation. In the centrifugation process, spermatozoa were obtained using a 90% Percoll density gradient. Progressive individual motility (%), sperm viability (%), sperm morphological abnormalities (%) and sperm membrane integrity (HOECHST/PI%) were evaluated. A diluent effect was observed ($p < 0001$), but there was no centrifugation action ($p \geq 0.05$). When using the 6% glycerol diluent, progressive individual motility (60.59 ± 2.94 %), sperm vitality (59.47 ± 2.97 %) and the number of sperm cells with an intact HOECHST membrane (52.57 ± 1.59) were higher compared to Dimethylacetamide 6% (39.88 ± 2.94 ; 23.71 ± 2.97 ; 34.73 ± 1.59) respectively. Also, there was an interaction ($p = 0.02$) between the type of diluent and centrifugation on sperm vitality, where the centrifuged 6% Dimethylacetamide samples had a higher percentage of living cells than without centrifugation. It was concluded that the use of 6% Dimethylacetamide as a cryoprotector is less efficient than 6% Glycerol, but centrifugation prior to seminal cryopreservation with 6% Dimethylacetamide promotes sperm quality.

Key words: Epididymis, Semen, sperm analysis, DMA, cryopreservation

3. Introducción

En el país, la ganadería bovina es uno de los sectores más productivos y rentables en el ámbito pecuario; ya que, aporta a la industria carne y leche, que conforman la canasta básica de la familia, por lo que se ven obligados a permanecer con modelos de competitividad y alta calidad (Moran&Blair, 2021). A pesar, de que en la mayoría de las ganaderías se utilicen biotecnologías para mejorar la condición genética y reproductiva de los hatos como es la inseminación artificial con semen congelado, ha habido inconsistencias en la calidad y obtención del semen que afecta su calidad y viabilidad (Marzina, 2013).

Entre los principales problemas que afectan la efectividad del semen es el shock térmico, cambios en la membrana espermática, acción de toxinas productos del metabolismo, acumulación de ácidos grasos y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno; por lo que, es necesario realizar una crioconservación adecuada (Denniston , Michelet, Bondioli, & Godke, 2011) (Boiso, 2001).

El uso de crioprotectores para mantener una correcta viabilidad del material espermático es de uso cotidiano en las empresas, el más utilizado es el glicerol; no obstante, los protocolos que utilizan este compuesto han causado toxicidad y en ocasiones actúa como contraceptivo por la lenta permeabilidad de la membrana celular, siendo necesario impartir con otras alternativas (Holt , 2000). Otro riesgo que afecta la viabilidad de los espermatozoides es el método de obtener semen; si bien es cierto, en los últimos años se ha utilizado medios convencionales para obtener semen en animales sanos como la vagina artificial y electro eyaculación; sin embargo, se ha tenido registros que animales con alto estrés ambiental o por enfermedad no reproductiva genera baja lividez y calidad seminal, lo que provoca la pérdida de material genérica (Martins , y otros, 2009). Otro inconveniente inevitable especialmente en la ganadería bovina, es la perdida de animales con alto valor genético, lo que ha provocado el aumento de técnicas reproductivas asistidas, dando a lugar nuevos métodos de recolección y crioconservación de material genético (Dobson & Smith , 2000) (Turri, Madeddu, Gliozzi, Gandini, & Pizzi, 2012).

Uno de los procesos experimentales es la recolección de espermatozoides epididimarios para la crioconservación; la ventaja de estos, es que se encuentran en el nivel 2 de maduración y no está combinada con el líquido seminal, además de que al manipular no presenta espuma, ni viscosidad y presenta los principales contaminantes como la orina o el suelo, como suele ocurrir en otros métodos de recolección (Canorio , 2008). Otro beneficio de dicha técnica, es que no es necesario de la presencia de una hembra en celo, no se realiza un entrenamiento previo del macho como en el caso de la vagina artificial, tampoco necesita equipos de altos costos como el electro eyaculador y tampoco es necesario que el animal este vivo, en el caso de que el animal haya tenido una muerte súbita (Martins , y otros, 2009).

Mientras tanto, los métodos de crioconservación para semen de animales se vienen trabajando desde 1949 con glicerol como es el caso de primates, bovinos y perros; sin embargo, se tiene datos que al utilizar este compuesto genera toxicidad en las muestras seminales, por consecuencia de su lenta permeabilidad en la membrana celular; por tal razón, es necesario utilizar otros crio conservadores como las amidas; estas, poseen bajo peso molecular, lo que permite que haya menor daño osmótico (Rasul, Ahmed, & Anzar, 2007) (Watson, 2000). Entre las amidas encontramos a la dimetilacetamida, teniendo buenos resultados en otras especies como los primates, aves, cabras, peces conejos, alpacas, entre otros (Yang, Norris, Winn, & Tiersch, 2010) (Feradis, y otros, 2001) (Seifi, Ahmad, Ansari, & Kohram, 2017). Existen estudios en donde demuestran la eficacia y potencia de los espermatozoides epididimales tanto fresco como crioconseravado.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto crioprotector de la dimetilacetamida en la crio supervivencia de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll, valorar la calidad, la cinética e integridad de las membranas plasmática, acrosomal y estrés osmótico de espermatozoides bovinos pre y post crioconservación.

4. Marco teórico

4.1 Métodos de recolección de semen

La recolección de semen es un proceso que se encuentra establecido como la base de la reproducción animal de manera artificial y el principal problema por sus diferentes factores que influye en su desnaturalización; por lo tanto, la recogida de la misma ha sido empleada bajo diversas investigaciones para obtener un eyaculado en condiciones integrales, pura, con propiedades biológicas estables y sin afectar en ningún sentido al macho (Lopez, 2016). Entre los métodos que se han ideado en el transcurso de los años encontramos:

4.1.1 Vagina artificial

Es una técnica que consiste que en un equipo de forma cilíndrica dura y resistente con un diámetro de 7 cm y entre 35 a 40 cm de largo; esta, se encuentra recubierta por una capa de goma que se dobla en los extremos del tubo formando una cuartera en donde se colocara aire y el agua caliente para simular la temperatura de una vagina natural (45-46°C); ya que, servirá como estímulo para que el toro eyacule (Morillo, Salazar, & Castillo, 2012). Otro estímulo que necesita el macho es brindar una monta falsa, mediante el uso de un maniquí; en razón de, que el animal necesita un apoyo que permita montar y desviar el pene con la palma manipulando la piel del prepucio sin ofrecer la vagina, de esta manera el toro bajara del maniquí y servirá como estímulo; en el siguiente intento de monta, se realiza el mismo procedimiento, con la diferencia que ahora se instala la punta del pene en la vagina artificial, permitiendo al toro empujar y eyacular (Rangel, y otros, 2009). Una de las desventajas es que esta técnica requiere de animales dóciles, entrenados y una hembra en celo (Barth, Arteaga, Brito, & Palmer, 2004).

4.1.2 Electroeyaculación

Es una técnica que permite que permite obtener semen de calidad, provenientes de toros sanos; sin embargo, como el anterior método es necesario a que el animal sea entrenado con anterioridad (Galina & Valencia, 2009). El equipo a utilizar se llama electroeyaculador; este, consiste de un electrodo conectado a una batería portátil produciendo estímulos rítmicos con descargas que no sobrepasen los 20 voltios o que estén entre 0 a 1000 miliamperios (Lopez, 2016). El proceso consiste en colocar el electrodo sobre la ampolla deferente y las glándulas vesicales; teniendo sumo cuidado en

ubicar este electrodo en el ano y moverlo hacia adelante y atrás, para que provoque el estímulo eléctrico a nivel nervioso y origine la erección en conjunta con la eyaculación. Cabe recalcar, que los estímulos iniciales deben ser suaves y se irán intensificando gradualmente hasta producir dicha eyaculación (Barth, Arteaga, Brito, & Palmer, 2004). Los impulsos eléctricos deben durar menos de 1 segundo y se empleara entre 5 a 10 impulsos dependiendo el grado de intensidad (Arieta, Fernández, & Menchaca, 2014).

4.1.3 Masaje rectal

Consiste en introducir el brazo del operante en el recto del toro a una distancia de 18 a 25 cm empleando sutiles masajes a nivel de las vesículas seminales con movimientos hacia adelante y atrás, con estrujado de las ampollas; las desventajas de este procedimiento es que las muestras salen contaminadas por estar en contacto con la orina y ciertas secreciones seminales, proveyendo de un eyaculado de baja calidad. (Lopez, 2016).

4.1.4 Recolección de semen del epidídimo

Esta técnica es de suma importancia, ya que es la única que permite recolectar material espermático post-mortem; incluso, se ha utilizado en animales en peligros de extinción. Los espermatozoides colectados se pueden crio conservar, utilizar en fresco e incluso ser usados para realizar fecundación *in vitro* o la inyección intracitoplasmática en oocitos.

El método de recolección epididimarios se lo realiza por diferentes métodos, como presenta (Barrios, 2002), tendiendo la:

- Recolección por flujo retrogrado
- Desmenuzamiento del epidídimo
- Método mixto

4.1.5 Recolección por flujo retrogrado:

Se disecciona los vasos deferentes y la cola del epidídimo de manera aséptica, se localiza el septum del epidídimo que está ubicado en la parte media de la cola; en dicho sector, se realiza un corte transversal, esto se realiza antes de que el túbulo se reduzca para obtener mayor cantidad de espermatozoides. La porción diseccionada de la cola del epidídimo se ubicará en un tubo de 50 ml; posteriormente, se colocará una aguja punta roma dentro del lumen de los vasos deferentes y mediante una jeringa “air-tite” se llenará con un medio para lavado “PBS modificad” y se perfundirá dentro de los vasos, mientras se presiona la

cola, hasta llegar a ver a nivel del corte transversal un fluido espeso y cremoso; este, será colectado. Dicho fluido será centrifugado a 300 rpm por 5 minutos, obteniendo un sobrenadante que será removido de la muestra.

4.1.6 Desmenuzamiento de la cola

La cola del epidídimo será disecada de manera aséptica, desmenuzada y colocada en una caja Petri teniendo entre 10 a 20 ml del medio PBS modificado. El contenido del mismo, se esparcirá en una jeringa “Air-tite” de 20 ml y colocará en un filtro con poros de tamaño 0.4- 0.75 micrones. El medio filtrado deberá contener espermatozoides epididimarios, este se centrifugará a 300 rpm por 5 minutos. La medición se realizará igual al método anteriormente nombrado.

4.1.7 Método mixto

Esta técnica se realiza del mismo modo que el método anterior hasta la obtención de la muestra de espermatozoide. En este proceso se medirá el volumen mediante la determinación visual del cilindro graduado. Su concentración, obtendrá por recuento en cámara hematocimétrica y la movilidad individual se realiza por observación al microscopio, midiendo el porcentaje de células móviles en la muestra.

4.2 Crioconservación de semen

En los últimos años se desarrollaron nuevos métodos para almacenar semen por tiempo más prolongados; mediante, la unión de componentes que mejoran el metabolismo celular, extendiendo su viabilidad y permitiendo enfriarlos hasta temperaturas menores a 0°C (Gao, y otros, 1995). Polge et al., (1949) lograron añadir agentes protectores para el semen congelado como es el glicerol; desde ese año, se expandió a nivel mundial para el mejoramiento animal, permitiendo generar inseminación artificial por semen congelado (Polge, Smith, & Parkes, 1949).

La crioconservación ha permitido mantener la diversidad genética de especies en peligro de extinción y bancos de material genético importante; no obstante, el daño celular a lo largo del proceso de la crioconservación de semen, pueda deberse a los cambios de temperatura, estrés osmótico, formación de cristales y hielo intracelular (Watson, 2000). Los crio conservantes se encuentran clasificados por dos grupos:

4.2.1 Penetrantes o de acción intracelular

Se caracterizan por tener menor peso molecular en comparación al segundo grupo de ACPs, por lo que penetran a la célula de manera uniforme y sin causar estrés osmótico. Una vez que ingresan al medio intracelular sustituyen el volumen de agua que va saliendo al medio extracelular causando una deshidratación celular adecuada y evitando el colapso por una deshidratación excesiva sobre todo cuando la velocidad de enfriamiento es lenta. Además, este mecanismo atenúa el incremento del medio hipertónico extracelular y evita la expansión de hielo al interior de la célula (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodriguez, 2002). Dentro de este grupo el más usado ha sido el glicerol, seguido del etilenglicol y actualmente, los del grupo amida, destacando el dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y dimetilformamida. Los ACPs penetrantes, en función de su concentración, podrían causar toxicidad a los espermatozoides, produciendo daño a la membrana plasmática y baja motilidad (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodriguez, 2002). Se sabe que el glicerol posee propiedades anticonceptivas a concentraciones tóxicas en algunas especies como el ave, además interactúa con el metabolismo de los espermatozoides, alterando la bicapa lipídica que posiblemente disminuye la eficacia de la reacción del acrosoma (Moce, Grasseau, & Blesbois, 2010).

4.2.2 No penetrantes o de acción extracelular

Además de evitar la formación de numerosos y grandes cristales de hielo intracelular, la mayoría de las células requieren la adición de solutos o agentes crioprotectores (ACPs). Hace más de 60 años fue descubierto el papel del glicerol como un ACP efectivo para los espermatozoides y los eritrocitos humanos en Mill Hill, Inglaterra (Polge et al., 1949). Este descubrimiento abrió las puertas a un nuevo tipo de estudio criobiológico porque se habían identificado nuevas variables que podrían usarse en la optimización de los protocolos de crio preservación (Watson, 1995). Son clasificados tradicionalmente en dos simples grupos, los penetrantes y los no penetrantes.

4.3 Métodos de recuperación espermática del epidídimo

Durante muchos años se ha utilizado los métodos de recolección de semen para establecer bancos de germoplasma procedentes de bovinos machos reproductores previamente seleccionados, teniendo los más comunes a la vagina artificial y electroeyaculador; no obstante, al morir un toro de alto valor genético se pierde la progenie de este animal (Arieta, Fernández, & Menchaca, 2014). Por lo que, el recuperar espermatozoides del epidídimo de animales recién sacrificados o muertos ha permitido salvaguardar el material genético de diversos animales; así como también, se ha

transformado en una herramienta para conservar el germoplasma de animales que hayan fallecido recientemente en peligro de extinción (Armas , Fernández , Vásquez , & Santiani , 2011). La importancia del epidídimo, en especial la cola del mismo, radica en que es uno de los lugares con mayor concentración de espermatozoides previamente a la eyaculación; ya que, el medio que provee al zoospermo permite su supervivencia por un rango mayor de tiempo, en el caso de que el animal haya muerto, reteniendo la motilidad y fertilidad (Ribeiro, Munita, Yumi, Mello, & Ferreira , 2014). Algunos autores indican que la cola del epidídimo provee de una mejor calidad de germoplasma; a pesar de ello, no ha sido tan explorada a nivel comercial (Yu & Leibo , 2002). Entre los métodos utilizados encontramos el de flujo retrogrado y desmenuzamiento del epidídimo; (Benítez, Chamba, Sánchez, Luzón, & Sánchez, 2018) indican que ambas técnicas permiten obtener espermatozoides con buena viabilidad. La colecta del flujo retrogrado consiste en separar al epidídimo del testículo y colocarlo sobre una caja Petri con lactato de ringer (precalentado a 37°C), para limpiarlo de residuos sanguíneos; posteriormente, se delimita la zona media de la cola del epidídimo para realizar un corte transversal, se coloca una aguja dentro del vaso deferente libre, con una jeringa de 5 a 10 ml lleno con “ medio de lavado” (PBS modificado) en una temperatura de 37°C, se coloca en sobre las paredes de los vasos deferentes, evitando la pérdida del medio; el fluido obtenido de estos serán los espermatozoides y el medio, este se centrifugara a 300g/5min para concentrar la muestra (Albers & Barrios , 2006). Mientras que la otra técnica llamada desmenuzamiento del epidídimo, trata de separar de manera aséptica el epidídimo del testículo, de igual manera se coloca al epidídimo en una caja Petri con lactato de ringer precalentado a 37°C; posteriormente, se realizó el método de slicing, que no es nada más que el picado en trozos por medio de tijeras quirúrgicas y colocarlos en cajas Petri, con el fin de recuperar los espermatozoides; en dicha caja se colocara 20 ml del medio PBS a 37°C, de este resultado se succionara 20 ml, para purificarlos por medio de filtración, este líquido se centrifugara a 300g/5min para concentrar la muestra; cabe señalar, que se debe descartar el sobrenadante del resultado final en ambas técnicas y a su vez la muestra se adhiere en yema de huevo-Tris-glicerol (Benítez, Chamba, Sánchez, Luzón, & Sánchez, 2018).

4.4 Fisiología espermática y espermatogénesis

Las células germinales masculinas son haploides, con alta especificidad que se producen a nivel de los túbulos seminíferos de los testículos; por medio dela espermatogénesis. Este proceso es la consecuencia de diversas divisiones mitóticas y

meióticas de las espermatogonias, esto se inicia en la adolescencia del individuo; en el toro adulto dura 61 días (Matorras, Hernandez, & Molero, 2008). Lo gonocitos primarios se diferencia en espermatogonias en la última etapa de la pre-pubertad, generando diversas divisiones mitóticas para conservar la concentración de espermatogonias tipo A y producir la del tipo B; dando lugar a los espermatoцитos primarios, llamando a esta etapa como espermatoцитogénesis (Schulz, y otros, 2010). Posteriormente, la segunda fase inicia con la primera división meiótica; en donde, el espermatoцитo primario diploide forma 2 espermatoцитos secundarios haploides; inmediatamente, ocasionará la segunda división meiótica originando las espermátidas con características más definidas; este proceso se llama espermatoídogenesis (Rodríguez & Geisinger, 2021). Las espermátidas inician a diferenciarse, presentando cambios morfológicos como la cola y cabeza, sin cambios en la carga cromosomal, conociendo esta etapa como espermiogénesis. Por último, las uniones entre las espermátidas maduras y células de Sertoli se rompen, permitiendo llegar al lumen de los túbulos seminíferos, produciendo la condensación del núcleo y la pérdida de gran parte del citoplasma; madurando el cuello y cola del espermatozoides (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).

4.5 Capacitación espermática

Este proceso ocurre cuando el espermatozoides ingresa de a la vagina o cérvix de acuerdo a la especie mamífero que se especifique y es transportado hacia el útero y oviductos; durante esta etapa el espermatozoides pasa por un cambio en su ambiente, en uno que contiene glucosa, colesterol, triglicéridos, albumina y oligoelemento llamado este conjunto de sustancias como líquido seminal; a uno, con aspecto mucoso cargado de calcio y albumina llamado moco uterino. El principal cambio del espermatozoides es en la membrana volviéndola más flexible; debido a que el colesterol existente en esta sale, por la albumina del moco uterino, permitiendo a su vez, la pérdida de fosfolípidos aumentando la fosfatidilserina, favoreciendo la unión de la membrana plasmática y acromosomal externa; entre otros cambios, se destaca la alteración del glicoproteínas, fosfolípidos, el calcio intracelular y aumento de movilidad flagelar (Ávalos, González, Vargas, & Herrera, 2018).

4.6 Evaluación de la función del espermatozoides por medio del sistema computarizado de análisis seminal (casa).

El sistema CASA fue creado en los años 70's y ha evolucionado constantemente, al inicio se basaba como una técnica que utiliza estroboscópicas de iluminación, que permitía capturar la imagen en una película fotográfica, dejando un anillo de movimiento

de la célula (Overstreet, Katz, Hanson, & Fonseca, 1979). Entre las modificaciones que se lo ha realizado en las últimas décadas es el aumento de la calidad de imagen del microscopio, disminución del tamaño de las computadoras y ampliación del lenguaje informático-algoritmo (Amann & Waberski, 2014). La técnica consiste en proyectar imágenes secuenciales de suspensión de esperma en un molde de detección, permitiendo revelar objetos por medio de la intensidad de píxeles utilizando un software que reproduce los resultados obtenidos (Boyers, Davis, & Katz, 1989). El principal objetivo de este, es analizar la morfología, morfometría y cinética del espermatozoide, accediendo a una comparación cuantitativa de los diferentes parámetros seminales (Yeste, 2016)

4.6.1 Parámetros seminales “casa”

4.6.1.1 Cinética

El sistema CASA posee un mecanismo de movilidad espermática y una platina calefactora que permite el análisis correcto utilizando diferentes factores, como es la incidencia de luz y tiempos de captura, para determinar la movilidad y desplazamiento de la cabeza del espermatozoide por un determinado tiempo (Amann & Waberski, 2014). Al inicio, se realiza la captura por imagen del centro de la cabeza de cada espermatozoide, denominados como centroides, cada representación constituye un segmento de video procesado por un análisis matemático de probabilidad, constituidos por algoritmos (Figura 1). Al tener imágenes secuenciadas y unir las, van a formar diferentes puntos de centroides de un mismo espermatozoide, que al unir las nos darán la trayectoria curvilínea. En el caso de que las imágenes presenten cruces de otros espermatozoides, es necesario calcular diversos parámetros para mejorar la calidad del movimiento como son (Figura 3) (De Monserrat, 2017):

Velocidad lineal (VSL): Se mide por $\mu\text{m/s}$; siendo la distancia rectilínea transcurrida por un espermatozoide, desde el punto inicial al final.

Velocidad curvilínea (VCL): Es la distancia recorrida en función de tiempo en su trayectoria real, se mide en $\mu\text{m/s}$.

Velocidad media (VAP): Es la intercalación media entre los puntos de la trayectoria VCL, en función a la velocidad y tiempo. Se evalúa con $\mu\text{m/s}$.

Frecuencia de batida de la cola (BCF): Es el número de veces que la trayectoria del VCL cruza la trayectoria media. Se mide en Hz.

Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): Es la desviación de la trayectoria media de la posición del centroide en el trayecto curvilíneo. Se mide en μm

Desplazamiento medio angular de la cabeza (MAD): Es el Angulo de giro medio de la cabeza del espermatozoide en la VCL. Se mide en °.

A base de los parámetros anteriormente mencionados, se calculan 3 índices para caracterizar la calidad del movimiento, como son;

$$\text{Linealidad (LIN)} = \text{VSL/VCL}$$

$$\text{Rectitud (STR)} = \text{VSL/VAP}$$

$$\text{Oscilación (WOB)} = \text{VAP/VCL}$$

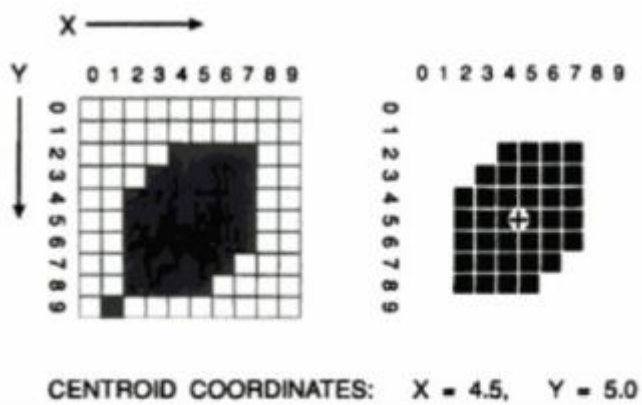


Figura 1. Identificación de los centroides

Fuente: (De Monserrat , 2017)

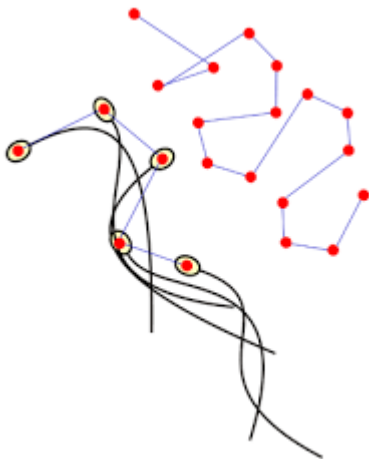


Figura 2. Recopilación de imágenes secuenciales del trayecto del espermatozoide

Fuente: (De Monserrat , 2017)

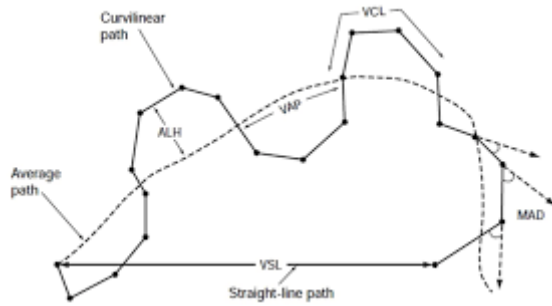


Figura 3. Variables cinemáticas de movilidad espermática medidas por los sistemas CASA

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

4.6.1.2 Morfología y morfometría

Al estudiar la morfología y morfometría del espermatozoide, nos refleja el estado fisiopatológico de los testículos, glándulas accesorias y epidídimo. Existen diversos detonantes para que la espermatogénesis se vea afectado como el estrés por ambiente, anomalías congénitas, patologías, abstinencia prolongada, entre otras. Las anomalías de los espermatozoides, se han clasificado de acuerdo al tamaño del espermatozoide (Figura 4), su forma (Figura 5), pieza intermedia (Figura 6) y según el tamaño de acrosoma y vacuolas (Figura 7) (Barth A. , 2000).

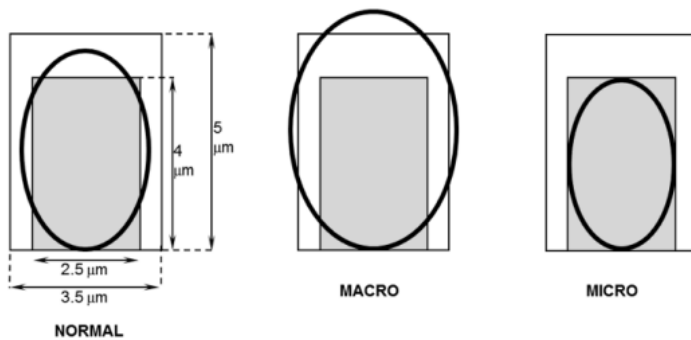


Figura 4. Clasificación según el tamaño del espermatozoide

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

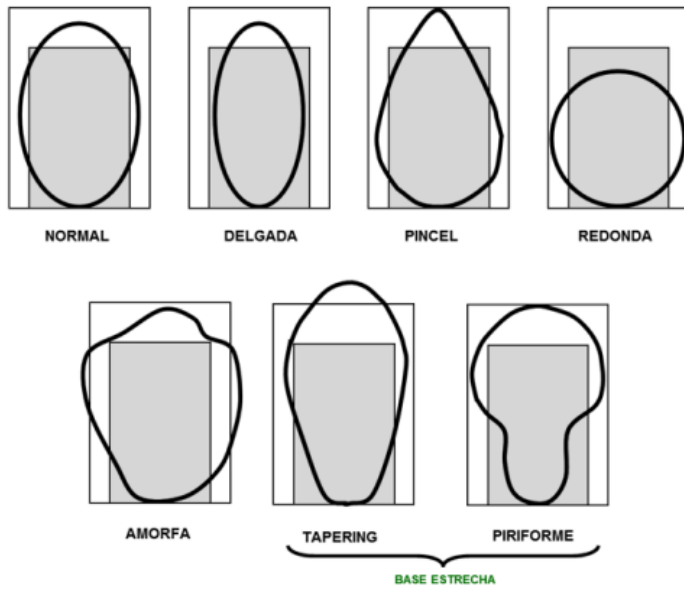


Figura 5. Clasificación según la forma del espermatozoide

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

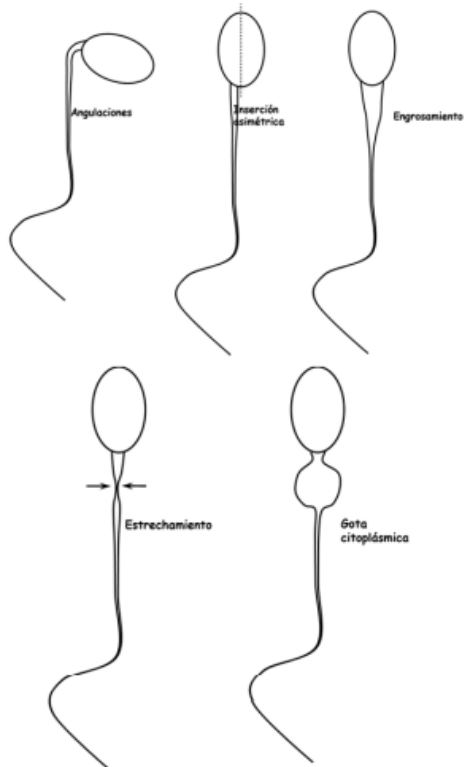


Figura 6. Clasificación según la pieza intermedia

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

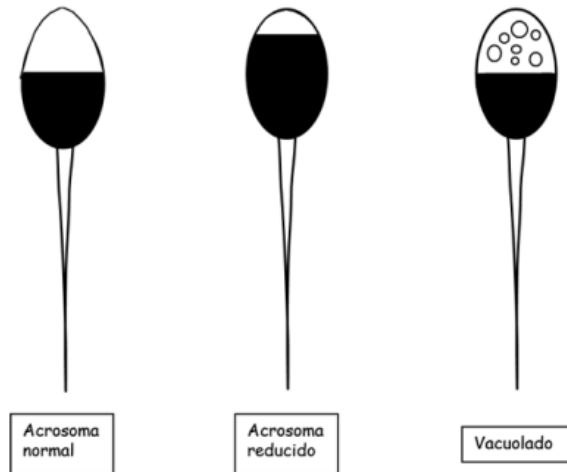


Figura 7. Clasificación según el tamaño de acrosoma y vacuolas

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

Los programas que analizan morfometría, miden la longitud de la cabeza, perímetro, área y ancho (Figura 8).

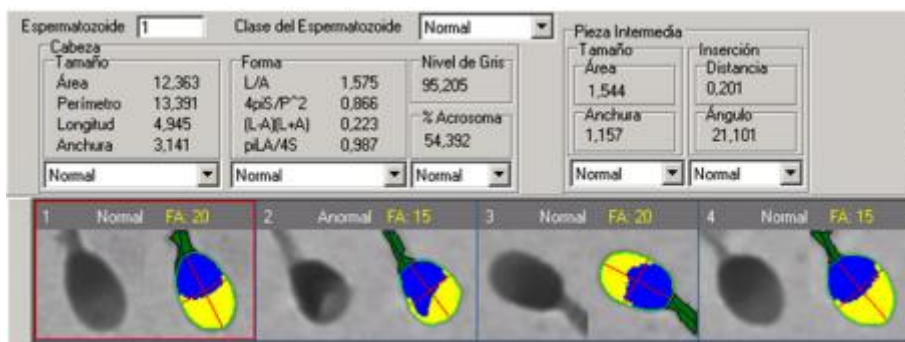


Figura 8. Clasificación morfométrica del espermatozoide en el sistema CASA

Fuente: (Rurangwa, Kime, Ollevier, & Nash, 2004)

4.7 Crioconservación del semen

Inició en 1776 en las manos de Lazzaro Spallanzani, quien observó, la viabilidad del semen después de ser enfriado por 30 minutos en nieve, concluyendo que, al exponer a los espermatozoides a temperaturas bajas, la actividad metabólica disminuye y se puede prolongar la vida del mismo (Barcat, 2009). Ivanov en 1913 descubrió que el semen congelado de un carnero muerto en la nieve, poseía espermatozoides vivos y viables para fecundar; dando inicio a la investigación de una técnica que permita prolongar la vida de los espermatozoides (Ivanov, 1926). La crioconservación se lo realizó aproximadamente en los años 70's; en la actualidad, aún existen problemas sin resolver por las diferencias fisiológicas entre especies e incluso entre individuos; debido a que la célula se expone a

daño por factores como cambios de temperatura, cristalizaciones a nivel citoplasmático, estrés oxidativo, alteración en el ADN y altas concentraciones de crioprotectores (Aller, Rebuffi, Cancino, & Alberio, 2003). Para la correcta conservación del semen es necesario utilizar diluyentes, que cumplen con la función de generar un medio propicio para los espermatozoides para mantener sus características y fertilidad adecuado (Watson, 2000). Entre los diluyentes más utilizados se encuentra la yema de huevo y la lecitina de soya (concentración de 1-1.5%), existen trabajos que han utilizado el fosfato sódico, potásico y yema de huevo, los espermatozoides se mantiene viables por 18 horas a una temperatura de - 4 a - 10° C. (Santiani, Ugarelli, & Evangelista, 2016)

4.8 Crioprotectores

Como se describió con anterioridad, uno de los problemas de la crioconservación es formar cristales de hielo a nivel intracelular, para poder corregir este problema se utilizan los agentes crioprotectores. Estas son sustancias hidrosolubles con toxicidad baja, que cumple con la función de disminuir el punto eutéctico de una solución; de manera, que la célula aumentará su deshidratación y disminuirá el estrés osmótico (Ávila, y otros, 2006). Existen 3 tipos de crioprotectores, según la bioquímica son los alcoholes, azúcares y dimetil sulfoxido; sin embargo, también se puede clasificar según la permeabilidad celular en penetrantes y no penetrantes (Terreros, Huanca, Arriaga, & Ampuero, 2015).

4.8.1 Crioprotectores penetrantes

Son sustancias que penetran intracelularmente, debido al bajo peso molecular que contienen; el modo de acción, es que una vez dentro de la célula reemplaza el agua del interior de la célula deshidratándolo, amortiguando el aumentando la cantidad de solutos extracelulares, imposibilitando la formación de cristales de hielo y así evadiendo el estrés osmótico (Córdova, y otros, 2015). Entre los más usados encontramos al dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol y propanediol (PROH); sin embargo, el dimetilacetamida (DMA) ha tomado fuerza en el ámbito reproductivo (Contreras , 2018). El DMSO es un solvente aprotico, soluble al agua con bajo peso molecular, su acción crio protectora se deriva a la capacidad de prevenir la sobreacumulación de electrolitos y otros compuestos durante la congelación; por ende, la formación de cristales intracelulares (Shu, Heimfeld, & Gao, 2014). El PROH actúa de manera similar al anterior mencionado; sin embargo, se ha utilizado mayoritariamente en congelación de blastocitos y embriones. En cambio, la DMA al pertenecer al grupo amida posee un peso molecular muy bajo, lo que permite

penetrar fácilmente a la célula, actuando de manera semejante al DMSO, se ha utilizado para conservar semen de peces, aves, primates, perros, ovinos y equinos.

4.8.2 Crioprotectores no penetrantes

Estas sustancias se caracterizan por poseer un peso molecular alto, por lo que no atraviesa la membrana plasmática celular; no obstante, le recubre externamente protegiéndole de los cristales de hielo, mediante puentes de hidrogeno generados por la correlación de los azucares el grupo fosfato de los fosfolípidos. Unas de las propiedades a tomar en cuenta es que se comporta de manera estable al enfriamiento rápido, provocando osmosis para que se deshidrate con mayor velocidad; además reduce la cristalización extracelular por el aumento de viscosidad en el medio. Estos agentes son empleados en compañía de azucares como la glucosa, fructuosa y lactosa; así mismo, con leche y yema de huevo.

4.9 PERCOLL

Percoll es una de las herramientas más usadas para realizar gradientes de densidad; está formada por una suspensión de partículas de ácido silicio envueltas de un compuesto procedente del polivinilo, actuando como membrana protectora a la célula del ácido silícico por su toxicidad, dando lugar a sustancias isoosmóticas con pH neutro y elevada densidad. El método se basa en centrifugar el semen a través de un coloide con diferentes gradientes para que la esperma con mayor gradiente se deposite al fondo del tubo y así forma diferentes capas; es decir, mientras la densidad se más alta esa capa tendrá espermatozoides vivos, mientras que la capa más superficial tendrá espermatozoides muertos, facilitando su separación

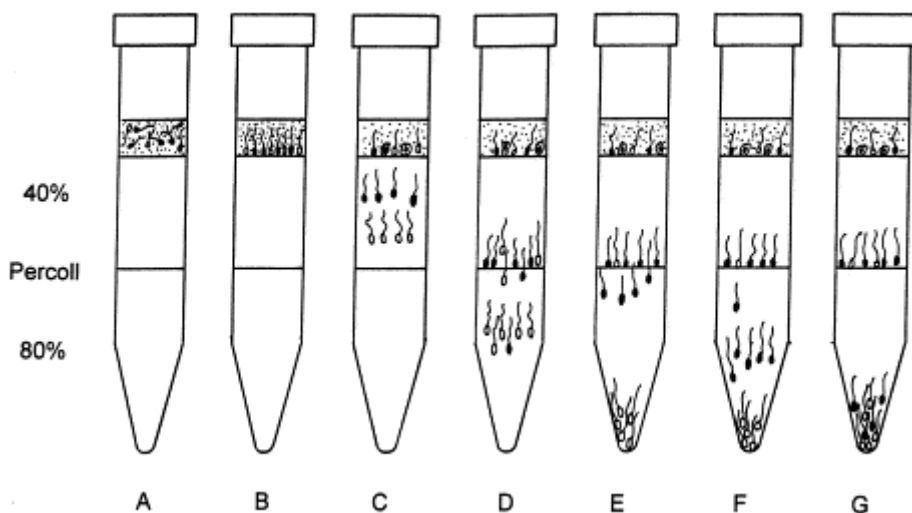


Figura 9. Secuencia de eventos durante la separación de espermatozoides con el uso de dos capas de Percol

5. Materiales y Metodología

5.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó en el “Camal Municipal de la Ciudad de Cuenca, en la provincia del Azuay, ubicado a 2505 msnm, con una temperatura media de 16,3°C y una pluviosidad media anual de 850mm. El camal está ubicado en Patamarca, 2°51’48’’ Latitud Sur, y 78°58’51’’ Longitud Occidental.

Las muestras espermáticas fueron procesadas en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Veterinaria de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca y en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria ubicado en ubicado en la parroquia Machangara, 2°52’53’’ Latitud Sur, y 78°57’30’’ Longitud Occidental, así como en la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja ubicado a, 4°02’03’’ Latitud Sur, y 79°12’12’’.



Figura 10. Mapa de la universidad católica de cuenca



Figura 11. Camal municipal de la ciudad de cuenca

5.2 Procedimiento

5.2.1 Enfoque metodológico

Esta investigación es un estudio de enfoque cuantitativo

5.2.2 Diseño de la investigación

La investigación realizada fue de tipo experimental con muestreo por conveniencia. En este estudio se cursaron dos fases, la primera fue la obtención de las muestras de toros faenados en el camal y posteriormente la fase de laboratorio donde se procesaron y analizaron las muestras espermáticas en el laboratorio después de aplicar los 4 tratamientos de crio preservación que fueron:

Tratamiento 1: Glicerol 6%

Tratamiento 2: Glicerol 6% + centrifugación

Tratamiento 3: Dimetilacetamida 6%

Tratamiento 4: Dimetilacetamida 6% + centrifugación

5.2.3 Tipo de muestreo y tamaño de la muestra

Se seleccionaron 40 testículos de toros, con una medida de circunferencia escrotal de 26- 46 cm y un rango de peso de 230 a 960 g. Se utilizaron 20 pares de epidídimos, colectados en la planta frenadora. Cada muestra espermática epididimaria debía tener una concentración mayor de 50×10^6 de espermatozoides por mililitro y una motilidad

superior al 30%. Se obtuvieron un total de 7 pulls de muestras espermáticas para conformar las partidas de semen.

5.2.4 Técnicas

5.2.4.1 Recolección de muestras

Los testículos de toros fueron colectados en la planta frenadora a través de la sección del cordón espermático, túnica vaginal y túnica albugínea. Posteriormente, se ubicaron en bolsas plásticas, almacenados en una caja térmica, manteniéndolos a una temperatura de 37°C y trasladados por 10 minutos hasta el laboratorio. Los testículos fueron lavados con solución fisiológica y la cola del epidídimo diseccionada del testículo y del tejido conectivo adyacente sobre cajas Petri. Luego, la cola del epidídimo fue secada con una gasa estéril y se obtuvieron los espermatozoides mediante el método de recolección por flujo retrógrado utilizando el diluyente base.

Con las muestras espermáticas colectadas de los epidídimos se conformaron pulls de espermatozoides para después ser divididos en los 4 grupos de tratamiento utilizando los respectivos diluyentes con crioprotector, siendo dos grupos centrifugados en gradiente de densidad de Percoll antes de la crio preservación.

5.2.4.2 Dilutor y crioprotectores

El diluyente base usado para la investigación fue el TCG-YH (Tris 313,7 milimolar - mM-), Acido cítrico 104,7 Mm, glucosa 30,3 mM y 50 microgramos mililitro -1 (ug ml-1) 50 gr amikacina, 20% de yema de huevo, 6 % crioprotector (glicerol, o DMA)

5.2.4.3 Columna de gradiente de densidad de Percoll

Se utilizó una solución de Percoll al 90%. Para preparar el gradiente de densidad de 45%, se tomaron 250 µl de Percoll al 90% y 250 µl de medio HTF. En el fondo de un microtubo estéril de 2 ml se colocaron 500 µl del gradiente de mayor densidad (Percoll al 90%), y en la parte superior se colocó 500 µl del Percoll al 45%, con el debido cuidado de no mezclar ambos gradientes. Finalmente se depositaron 200 µl de la mezcla de semen obtenida en el pull. Dicha columna se centrifugó a 200 g durante 10 minutos (Eppendorf,

Centrifugue 5702). El pellet se recuperó del fondo del tubo y se re-diluyó en el medio respectivo para su criopreservación.

5.2.4.4 Protocolo de criopreservación

Se utilizaron pajuelas de 0,25ml con una concentración espermática de 30×10^6 sptz/ml. El tiempo de estabilización a temperatura de refrigeración ($4 - 5^{\circ}\text{C}$) fue de 2 horas. Posteriormente, se mantuvieron las pajuelas en vapor de nitrógeno líquido (4 cm centímetros sobre el nivel) durante 12 minutos. Finalmente, las pajuelas fueron sumergidas en el nitrógeno, llegando a una temperatura de -196°C .

5.2.4.5 Evaluación espermática.

Para la evaluación de las siete partidas espermáticas, se realizó la descongelación de tres pajuelas por partida a 37°C durante 30 segundos en baño maría. La motilidad individual progresiva (%) fue evaluada colocándose la muestra espermática sobre un portaobjetos y con uso de cubreobjetos se observó mediante microscopía óptica en aumento de 400x.

La viabilidad espermática (%) se realizó por medio de un frotis de la muestra seminal utilizando la tinción de eosina-nigrosina y se observó mediante microscopía óptica con aumento de 400x. Los espermatozoides se consideraron vivos (sin tinción) y muertos (con tinción rosa), contando un total de 200 células espermáticas.

La evaluación morfológica se realizó en el frotis de la muestra seminal con tinción de eosina-nigrosina, mediante microscopía óptica con aumento de 1000x más aceite de inmersión, donde se determinó la cantidad y el tipo de anomalías espermáticas.

5.2.4.6 Evaluación de la membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática fue evaluada por medio de sondas fluorescentes PH-H342 como descrito por Celeghini et al. (2010). Para esta evaluación, las muestras fueron descongeladas a 37°C en baño maría. 150 μL fueron colocados en un microtubo de 600 μL , y se adicionaron las sondas fluorescentes: 3 μL de yodeto de Propídio (PI - 0,5 mg/mL, P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), 2 μL de Hoechst 33342 (H342 - 5mg/mL, Molecular probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), Las muestras fueron incubadas durante 10 min en oscuridad a 38°C . Finalmente fueron

evaluadas por microscopia de epifluorescencia (Zeiss Primostar 3, Alemania). Fueron contadas al menos 200 células de cada muestra y se obtuvo el porcentaje (%) de células con membrana íntegra (azul) y con alteración de membrana (rojo).

5.2.4.7 Variables de Estudio.

Variables independientes

- Tratamiento 1: Glicerol 6%
- Tratamiento 2: Glicerol 6% + centrifugación
- Tratamiento 3: Dimetilacetamida 6%
- Tratamiento 4: Dimetilacetamida 6% + centrifugación

Variables dependientes

- Motilidad individual progresiva (%)
- Viabilidad espermática (%)
- Anormalidades morfológicas espermáticas (%)
- HOECHST %
- PI %

5.2.4.8 Análisis estadístico y Diseño experimental

Para analizar los datos se utilizó un análisis de varianza con el procesador MIXED SAS (SAS en Denmond for Academics) donde los efectos fijos fueron considerados los grupos de tratamiento.

Para comparar las medidas se utilizó un T-TEST donde el P valor menor a 0,05 fue considerado como significativo

5. Resultados

Al ser evaluadas tres pajuelas de cada tratamiento de criopreservación espermática implementados en muestras de la cola del epidídimo de toros, se verificó un efecto principalmente del diluyente ($p < 0001$), sin embargo, no hubo efecto de la centrifugación ($p \geq 0,05$). Con el uso del diluyente Glicerol 6% independiente de centrifugación, la motilidad individual progresiva ($60,59 \pm 2,94$ %), vitalidad espermática ($59,47 \pm 2,97$ %) y la cantidad de células espermáticas con membrana íntegra HOECHST ($52,57 \pm 1,59$) fueron más elevadas en comparación con Dimetilacetamida 6%, ($39,88 \pm 2,94$; $23,71 \pm 2,97$; $34,73 \pm 1,59$) respectivamente.

Tabla 1. Media \pm error estándar de valores de espermograma pós-descongelación de muestras extraídas de la cola del epidídimo de toros criopreservadas con diferentes protocolos

	Tratamientos			
	Glicerol 6%	Glicerol 6% + centrifugación	Dimetilacetamida 6%	Dimetilacetamida 6% + centrifugación
Motilidad individual progresiva (%)	59,04 \pm 4,16	62,14 \pm 4,16	43,33 \pm 4,16	36,42 \pm 4,16
Vitalidad espermática (%)	63,14 \pm 4,20 ^a	55,80 \pm 4,20 ^a	17,47 \pm 4,20 ^c	29,95 \pm 4,20 ^b
Anormalidades morfológicas espermáticas (%)	40,38 \pm 2,27	35,19 \pm 2,27	37,09 \pm 2,27	35,95 \pm 2,27
HOECHST %	54,80 \pm 2,25	50,33 \pm 2,25	35,23 \pm 2,25	34,23 \pm 2,25
PI %	60,52 \pm 2,33	55,61 \pm 2,33	61,19 \pm 2,33	64,00 \pm 2,33

a, b c Letras minúsculas demuestran diferencia estadística ($p \leq 0,05$)

Además, se observó una interacción ($p = 0,02$) entre el tipo de diluyente y la centrifugación sobre la vitalidad espermática, siendo que con el uso de Glicerol 6% con o sin centrifugación se obtuvieron porcentajes más altos de células vivas y, al utilizar Dimetilacetamida 6% sin centrifugación se obtuvo el porcentaje más bajo de vitalidad.

Pero las muestras de Dimetilacetamida 6% centrifugadas presentaron mayor porcentaje de células vivas, que sin centrifugación.

No se observaron diferencias ($p \geq 0,05$) en anomalías morfológicas espermáticas o número de células con lesión de membrana reactivas a iodeto de propidio (PI) entre los tratamientos.

6. Discusión

Al utilizar Dimetilacetamida 6% sin centrifugación los valores fueron más bajos en vitalidad. Pero si la muestra con Dimetilacetamida 6% es centrifugada aumenta el porcentaje de células vivas; siendo, un efecto positivo de la técnica de centrifugación al usar este tipo de diluyente. Esto es debido a que la separación por gradiente de Percoll separa a los espermatozoides con mejor longitud de los telómeros; correlacionando a este como un factor de viabilidad, motilidad e integridad de membrana; así lo mostro (Iannuzzi, y otros, 2020) en su investigación sobre la evaluación de la longitud de los telómeros de espermatozoides como un biomarcador de la calidad de semen en toros sanos.

Además, en la presente investigación se observó que el glicerol presentó mejores resultados en todas las variables estudiadas, con excepción al número de células con lesión de membrana reactivas a iodeto de propidio (PI), independientemente al ser o no centrifugadas. Estos resultados demuestran que el uso de Dimetilacetamida 6% como diluyente para criopreservación genera más daños a la membrana plasmática del espermatozoide (Celeghini et al., 2010) diferente al uso tradicional de glicerol. Cabe destacar, que los estudios sobre el uso de estos crioconservantes en diferentes concentraciones en esta especie son escasos.

En un trabajo sobre el uso de dimetilacetamida asociado a glicerol para crioconservación de semen ovino se obtuvo similares resultados que el presente estudio; ya que, al utilizar al glicerol con una concentración del 6% alcanzo una motilidad progresiva de $62,6 \pm 14,3\%$ e integridad estructural da membrana plasmática de $32,3 \pm 15,2\%$ siendo superior al del dimetilacetamida con concentraciones del 3% y 5% + 1% glicerol con resultados de ($46,3 \pm 17,9\%$ - $38,9 \pm 17,1\%$) y ($32,6 \pm 13,2\%$ - $22,5 \pm 15,8\%$) respectivamente (Oliveira , y otros, 2018).

Así mismo, (Lv, y otros, 2020) realizaron una investigación sobre el uso de crocina sobre la apoptosis de espermatozoide en ganado amarillo Yanbian, observó que el tratamiento con glicerol al 6% obtuvo el mejor resultado en motilidad ($58,22 \pm 2,03\%$) e integridad de la membrana ($45,68 \pm 0,70\%$). También (Trujillo, 2017) en su trabajo sobre la crioconservación de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol (6%, 7% y 8%) obtuvo valores de motilidad progresiva, vivos y anormalidades totales con resultados del ($63,69\%$, $72,34\%$ $56,69\%$), ($70,63\%$, $82,36$ $65,6\%$) y ($11,13\%$, $8,40\%$, $12,16\%$) respectivamente.

Sin embargo, (Contreras, Ruiz, & Santiani, 2020) realizaron la evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpacas; los mismos, realizaron 3 concentraciones (1%, 3.5% y 7%) con cada agente crioprotector, valorando motilidad, viabilidad espermática y potencial de membrana mitocondrial, alcanzando los mejores valores con el 1 % de concentración de dimetilacetamida $17,45 \pm 5,60\%$, $18,65 \pm 3,41\%$ y $19,36 \pm 3,46\%$ correspondientemente. Es importante destacar que estos valores son relativamente bajos en comparación con los valores espermáticos esperados para criopreservación de semen bovino.

(Freitas, y otros, 2018) estudiaron sobre la capacidad del efecto crioprotector de la dimetilacetamida (DMA) en dos concentraciones (3% y 6%) y la interacción de estas con la trehalosa en carneros Santa Inés, teniendo como control a glicerol al 6%. Los tratamientos fueron: glicerol 6%, DMA 6%, DMA 3%, DMA 3% + trehalosa y DMA 6% + trehalosa; estos, evaluaron la cinética del espermáticas post-crio conservada, siendo el mejor valor de la motilidad progresiva del $75,2 \pm 08,7\%$ con el glicerol al 6%, seguido del DMA al 3% con $60,6 \pm 14,2\%$ y el DMA 6% con $32,2 \pm 20,5\%$; así mismo, la integridad de la membrana plasmática tuvo el mejor porcentaje el $57,2 \pm 12,8$ (Glicerol 6%) $49,8 \pm 12,6$ (DMA al 3%) $24,3 \pm 16,5$ (DMA 6%).

Las altas concentraciones de DMA afecta considerablemente la calidad y sobrevivencia de los espermatozoides como son los ratones cerdos, cabras y alpacas; teniendo un nivel de tolerancia del 1% al 3% (Banda, y otros, 2010) (Blanco, Gee, Wildt, & Donoghue, 2000). Sin embargo, en otras especies como los gallos poseen una mejor tolerancia, (Rakha, y otros, 2017) comparo las diferentes concentraciones de DMA (4%, 6%, 8% y 10%) para crioconservar el semen de gallo, obteniendo al 6% como el mejor resultado. Esto se puede deberse a que dichos animales contienen mayor proporción de valina (aminoácido) en el plasma seminal en comparación con los mamíferos, permitiendo resistir el daño al ADN y de la membrana durante los procesos de crioconservación. En cambio, el glicerol ha tenido excelentes resultados, debido a que preexiste una concentración que se adecua con casi todas las especies, permitiendo penetrar de mejor manera el interior de la célula, previniendo la formación de hielo a nivel intracelular (Moreno & Galarza, 2019).

7. Conclusión

Al evaluar el efecto crioprotector de la dimetilacetamida en la crío supervivencia de espermatozoides epididimarios bovinos seleccionados con percoll, se concluye que el uso de Dimetilacetamida al 6% es menos eficiente, ya que se obtuvieron valores menores de motilidad individual progresiva, vitalidad espermática, y menor integralidad de la membrana plasmática en comparación con el uso de Glicerol al 6%.

La centrifugación previa a la criopreservación seminal con Dimetilacetamida 6% favorece a la calidad espermática, ya que aumenta el porcentaje de células vivas en comparación a sin centrifugación. Sin embargo, la centrifugación no beneficia a la criopreservación espermática al utilizar Glicerol al 6%.

8. Recomendaciones

Realizar una investigación previa sobre el uso de diferentes concentraciones de dimetilacetamida en la crioconservación de esperma de toro, para determinar hasta qué grado es tolerable la sustancia para que no sea toxico para la célula.

Tener en cuenta los valores de concentración del glicerol; ya que, hay investigaciones que tienen un mejor resultado al usarlo con el 7%.

Al utilizar dimetilacetamida al 6% como crioprotector, se recomienda centrifugar las muestras espermáticas previo a su criopreservación.

9. Bibliografía

- Albers , M., & Barrios , D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootec Trop*, 24: 267-280.
- Aller, J., Rebuffi, G., Cancino, K., & Alberio, R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama glama). *Arch Zootec*, 52: 15- 23.
- Amann, R., & Waberski, D. (2014). Análisis de esperma asistido por computadora (CASA): capacidades y desarrollos potenciales. *Theriogenology*, 81(1):5-17.
- Amann, R., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81 5–17.
- Arieta, R., Fernández, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Rev Elec Vet.*, 15(5): 1–8.
- Armas , R., Fernández , A., Vásquez , C., & Santiani , A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.*, 3 (22):199-207.
- Ávalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal*. Ciudad de Mexico: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*, 57 (4).
- Banda , J., Evangelista , S., Ruiz , L., Sandoval , R., Rodríguez , C., & Valdivia , M. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 21: 145-153.
- Barcat, J. (2009). Lazzaro Spallanzani y la inseminación artificial. *Medicina (B. Aires)*, 69(4).
- Barrios, D. (2002). *Evaluación de la calidad de capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem*. Trujillo: XI Congreso Venezolano de producción e industria animal.

- Barth, A. (2000). *Bull breeding soundness evaluation manual. 2nd ed.* The Western Canadian Association of Bovine.
- Barth, D., Arteaga, A., Brito, F., & Palmer, C. (2004). Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Anim Reprod Sci*, 84(3-4):315-25.
- Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón, F., & Sánchez, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico vet*, 8 (1).
- Blanco, J., Gee, G., Wildt, D., & Donoghue, A. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod*, 63: 1164-1171.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18: 4-6.
- Boyers, S., Davis, R., & Katz, D. (1989). Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil*, 12:167-200.
- Canorio, N. (2008). *Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (Lama pacos). Tesis de Magíster.* Lima, Perú: Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos.
- Contreras, W. (2018). *Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida (Tesis de grado).* Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
- Contreras, W., Ruiz, L., & Santiani, A. (2020). Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev. investig. vet. Perú*, 31 (1).
- Córdova, A., Guerra, J., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juárez, M., & Pérez, J. (2015). CONGELACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2):22-40.
- Coubrough, R. (1985). Stress and fertility. A review. *Onderstepoort J Vet Res.*, 52 (3):153-156.
- De Monserrat, J. (2017). Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. *Ed Cont Lab Clín*, 32: 82 - 111.
- Denniston, R., Michelet, S., Bondioli, K., & Godke, R. (2011). *Principles of embryo cryopreservation. In: Tiersch TH, CC Grenn (eds). Cryopreservation in aquatic species. 2nd ed.* USA: World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Dobson, H., & Smith, R. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.*, 2 (60-61):743-52.

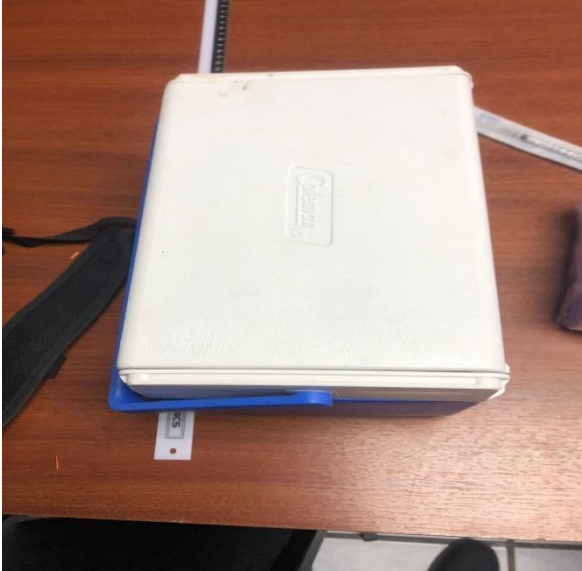
- Feradis, A., Suatha, L., Amin, M., Yusuf, T., Sajuthi, D., Budiarsa, L., & Hayes, E. (2001). Cryopreservation of epididimal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol*, 30:100-106.
- Fernández, S., & Novoa, C. (1968). Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev Med Vet Univ Nac Mayor San Marcos*, 22:19-35.
- Freitas, R., Obab, E., Almeida, C., Costa, H., Vasconcelos, M., Oliveira, G., . . . Ribeiro, A. (2018). Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 85: 1-6.
- Galina, C., & Valencia, J. (2009). *nseminación artificial en el bovino*. Mexico D.F.: Limusa.
- Gao, D., Liu, J., Liu, C., McGann, L., Watson, P., Kleinhans, F., . . . Critser, J. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod*, 10:1109-1122.
- Hernandez, A., Quintero, A., Nava, H., & Osorio, C. (2015). *Efecto del gradiente de Percoll sobre la vitalidad y la integridad del acrosoma en espermatozoides criopreservados de toros Brahaman*. UNESUR. GIFEPA.
- Holt , W. (2000). Basic aspects of frozenstorage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.
- Iannuzzi, A., Della, G., Russo, M., Longobardi, V., Albero, G., Canditiis, C., . . . Gasparrini, B. (2020). El estudio tuvo como objetivo evaluar si la longitud de los telómeros de los espermatozoides puede considerarse como un nuevo biomarcador de la calidad del esperma en toros. La longitud de los telómeros espermáticos se evaluó mediante PCR cuantitativa mól. *Theriogenology*, 158: 227-232. .
- Ivanov, E. (1926). La fecundación artificial como método zootécnico. *Higiene y Sanidad Pecuarias*, 16 (102).
- Lopez, J. (2016). *Colecta de semen en las distintas especies*. Obtenido de Reproduccionveterinaria (R.vet): <https://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/colecta-de-semen/#:~:text=Son%20varios%20los%20m%C3%A9todos%20que,artificial%20C%20masaje%20y%20la%20electroeyaculaci%C3%B3n>.
- Lv, Y., Chen, X., Xu, D., Luo, X., Cheng, M., Zhang, Y., . . . Jin, Y. (2020). Effects of crocin on frozen-thawed sperm apoptosis, protamine expression and membrane lipid oxidation in Yanbian yellow cattle. *Reprod Domest Anim*, 55(8):1011-1020.
- Martins , C., Driessen , K., Melo , P., Carvalho, J., De Sousa, R., Rumpf , R., & Dodec , M. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine

- spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*, 116:50-57.
- Matorras, R., Hernandez, J., & Molero, D. (2008). *Tratado de Reproducción Humana para Enfermería*. Bogota: Panamericana.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodriguez, J. (2002). Current status of cryopreservation: why isn't it better?. *Therio*, 57:327-344.
- Moce, E., Grasseau, I., & Blesbois, E. (2010). Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim Reprod Sci*, 122:359-366.
- Moreno, J., & Galarza, D. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2): 18-38.
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. Maracay, Venezuela: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Oliveira, G., Freitas, R., Ribeiro, A., Cardoso, F., Andrade, M., & Sateles, E. (2018). Dimetilacetamida associada ou não ao glicerol para criopreservação de sêmen ovino. *Ciênc. anim. bras.*, 19: 1-10.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Colom Cienc Pecua*, 19 (4).
- Overstreet, J., Katz, F., Hanson, F., & Fonseca, J. (1979). A simple, inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.*, 31:162-172.
- Polge, C., Smith, A., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666.
- Rakha, B., Ansari, M., Akhter, S., Zafar, Z., Naseer, A., Hussain, I., & Santiago-Moreno, J. (2017). Dimethyleacetamide improves the cryosurvivability of Indian red ungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Therio*, 78:27-33.
- Rangel, L., Alarcón, M., Galina, C., Hernandez, J., Porras, A., Valencia, J., . . . Paramo, R. (2009). *Manual de practicas de reproducción*. Ciudad de Mexico D.F.: Universidad Autonoma de Mexico. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Rasul, Z., Ahmed, N., & Anzar, M. (2007). Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glicerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Therio*, 68: 813-819.
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., & Ferreira, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch. med. vet.*, 46(1).

- Rodríguez, R., & Geisinger, A. (2021). Contributions of flow cytometry to the molecular study of. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3): 1151.
- Rurangwa, E., Kime, F., Ollevier, F., & Nash, J. (2004). The measurements of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234:1-28.
- Santiani, A., Ugarelli, A., & Evangelista, S. (2016). Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, 173:49-55.
- Schulz, R., de França, W., Lareyre, R., LeGac, J., Chiarini, H., Nobrega, R., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish", General and Comparative Endocrinology. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 390–411.
- Seifi, A., Ahmad, E., Ansari, M., & Kohram, H. (2017). Effect of addition of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezability of Mahabadi goat semen. *Cryobiology*, 75:15-20.
- Shu, Z., Heimfeld, S., & Gao, D. (2014). Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before. *Bone Marrow Transplant.*, 49(4): 469-76.
- Terreros, M., Huanca, W., Arriaga, I., & Ampuero, A. (2015). Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 26(3): 420-426.
- Trujillo, D. (2017). *Criopreservacion de semen caprino utilizando dif acion de semen caprino utilizando diferentes (Tesis de grado)*. Bogota. Colombia: Universidad de la Salle, Facultad de ciencias agropecuarias.
- Turri, F., Madeddu, T., Gliozzi, G., Gandini, F., & Pizzi, F. (2012). nfluence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 47(5), 712-717.
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. *Reprod Fert Dev*, 7:871-891.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* , 60: 481±92.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* , 60: 481-492.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60: 481–92.

- Yang, H., Norris, M., Winn, R., & Tiersch, T. (2010). Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka. *Oryzias latipes*. *Cryobiology*, 61:211-9.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 1;85(1):47-64.
- Yu, I., & Leibo, S. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. *Theriogenology*, 3(57):1179-1189.
- Zhao, F., Yang, Q., Shi, S., Shi, X., & Suna, Y. (2016). Semen preparation methods and sperm telomere length: density gradient centrifugation versus the swim up procedure. *Sci Rep*, 6:39051.

10. Anexos



Anexo 1. Transporte de muestras



Anexo 2. Colocación del medio en el epidídimo



Anexo 3. Colecta seminal epididimarios



Anexo 4. Revisión del pull