

**COMPARACIÓN DE LOS DOS DIFERENTES TIPOS DE CONGELACIÓN EN EQUINOS**

**(MONOGRAFIA)**



**Fabián C. Rodríguez Martínez**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Sede (Bogotá), Colombia**

**2023**

**COMPARACIÓN DE LOS DOS DIFERENTES TIPOS DE CONGELACIÓN EN EQUINOS  
(MONOGRAFIA)**



**Fabián C. Rodríguez Martínez**

**Código estudiantil UAN**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;**

**Médico Veterinario**

**Director**

**Sebastián Bonilla, M.V, MSc, PhD**

**Universidad Antonio Nariño**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Sede (Bogotá), Colombia**

**2023**

**Contenido****Página**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>5</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>1.    Objetivo general.....</b>	<b>8</b>
<b>2.    Objetivo específico.....</b>	<b>8</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1 Definición Espermatozoide.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1.1 Espermatogénesis.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1.1.2 Estructura del espermatozoide equino.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1.1.3 Fisiología espermática.....</b>	<b>11</b>
<b>4.2 Fertilidad.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.1 Motilidad espermática.....</b>	<b>12</b>
<b>4.2.2.2 Reacciones Acrosómica.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Criopreservación.....</b>	<b>13</b>
<b>4.3.1 Beneficios.....</b>	<b>14</b>

4.3.2 Criopreservación y daño en los espermatozoides.....	14
4.4 Tipo de crioprotectores.....	15
4.5 congelación con vapores de nitrógeno.....	16
4.6 congelación de semen con bio congeladores.....	16
MARCO ANTECEDENTES.....	17
MARCO METODOLÓGICO.....	20
6.1 Materiales.....	20
6.2. Búsqueda y revisión.....	21
6.2.1 Criterios de exclusión bibliográfica.....	21
Discusión.....	21
Conclusiones.....	23
REFERENCIAS.....	24

## Resumen

La criopreservación se ha posicionado como un excelente método en la industria equina gracias a que favorece el mejoramiento genético. (Peña et al., 2011). Por esto se desarrollan diversos estudios, con el objetivo de perfeccionar biotecnología enfocada en la reproducción, entre estas la congelación del semen e inseminación artificial (Medeiros et al 2002).

Se busca conocer qué efectos tiene el vapor de nitrógeno a diferentes distancias sobre la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación permitiendo evaluar en qué tratamiento se generan cambios significativos en los parámetros mencionados anteriormente. Se debe considerar que esta biotecnología favorece la obtención de más pajuelas por eyaculado lo que se traduce en poder disponer de mayor número de yeguas inseminadas, además facilita el comercio en gran medida gracias a que la distribución del semen es mucho más fácil tanto a nivel nacional como internacional. Con estos motivos es que se realizará este estudio.

El objetivo general de esta investigación se basó en generar una discusión y comparación sobre los métodos de congelación tradicional de vapor de nitrógeno y el actual el cual emplea el uso de bio congeladores.

**Palabras clave:** Criopreservación, Mejoramiento genético, Biotecnología,

### **Abstract**

Cryopreservation has positioned itself as an excellent method in the equine industry thanks to the fact that it favors genetic improvement. (Peña et al., 2011). For this reason, various studies are carried out, with the objective of perfecting biotechnology focused on reproduction, among them semen freezing and artificial insemination (Medeiros et al 2002).

It seeks to know what effects nitrogen vapor has at different distances on post-thawing sperm motility and viability to evaluate which treatment generates significant changes in the parameters mentioned above. It should be considered that this biotechnology favors the obtaining of more straws per ejaculate, which translates into being able to have a greater number of inseminated mares, also facilitates trade to a great extent thanks to the fact that the distribution of semen is much easier both at the national level as international. It is for these reasons that this study is carried out.

The general objective of this research was based on generating a discussion and comparison about the traditional freezing methods of nitrogen vapor and the current one which uses the use of bio-freezers.

**Keywords:** Cryopreservation, Genetic improvement, Biotechnology,

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criopreservación es una biotecnología empleada en la reproducción, basada en la congelación del semen para conservar el material genético de ejemplares equinos machos considerados de alto valor dentro de su área de trabajo o producción y así poder incrementar el número de yeguas servidas por eyaculado (Davies y Mina. 2003), una ventaja que resalta bastante de implementar la criopreservación es la capacidad de reducir en gran medida el riesgo de transmisión frente a enfermedades venéreas (loomis y Graham, 2008), se logra esto gracias a que las posibilidades de invasiones de origen bacteriano sobre el útero se reducen a comparación de aquellas que se presentan al implementar la monta natural evitándose así una endometritis (Clement, 1993). Es bien conocido que la calidad de semen equino bajo los efectos de la congelación es bastante menor a comparación de el de otras especies más sin embargo el interés de implementar esta biotecnología persiste entre los criaderos equinos ya que la idea de disponer de forma rápida y sencilla sobre el semen en cualquier momento resulta bastante beneficiosa (Albrizido et al., 2015), debido a diversas individuales solo un pequeño porcentaje de los sementales responden de forma favorable al proceso de congelación (Barbas y Mascarenhas, 2009). Se atribuye un 20% que representan aquellos sementales cuyo semen responde de forma favorable a la criopreservación (Tischne, 1979), por otra parte, el 60% de los sementales manifestaron un resultado aceptable en su semen y otro 20% se manifiesta deficiente bajo la congelación (Sieme et al., 2008; kuisma et al., 2006)

La criopreservación es el procedimiento más deseado para disponer de material genético. El proceso de criopreservación seminal involucra diferentes metodologías orientadas a prevenir las afectaciones celulares generadas durante el proceso de congelación – descongelación principalmente daños estructurales, bioquímicos y funcionales (Maxwell et al., 1993) se busca prevenir daños celulares causados por choques térmicos, formación de cristaloides de hielo, deshidratación, el aumento de la concentración de sales o la presencia de un choque osmótico (stanic et al., 2000).

La congelación de material genético puede llevarse a cabo por el método convencional siendo el más común el cual emplea vapores de nitrógeno líquido. Sin embargo, diversos parámetros espermáticos como la supervivencia, integridad celular, funcionalidad de las mismas en su membrana espermática generalmente se disminuyen durante el proceso de congelación y descongelación. La congelación tradicional brinda una velocidad de enfriamiento inicial muy rápida para después pasar a una velocidad considerablemente más lenta denominada deceleración (Anel et al., 2003). Esta velocidad de enfriamiento al disminuir estimula la formación de cristales de hielo sobre las células espermáticas además de generar un choque de frío (Hammadeh et al., 2001). Se considera que la criopreservación convencional al usar velocidades de enfriamiento altas predispone a la formación de hielo intracelular por ello se cree que no es la más idónea, ya que esto genera sus respectivos daños celulares por las lesiones criogénicas (Mazur, 1984) por lo mencionado anteriormente se ha logrado establecer métodos alternativos para la congelación seminal, como el uso de bio congeladores con capacidades de enfriamiento a velocidades controladas y crecientes (Esteso et al., 2018), además de disponer de congelación ultrarrápida (Pradiee et al., 2015) Los bio congeladores representan beneficios al momento de congelar el material genético ya que dispone de velocidades bajas en el momento de disipar el calor evitando mediante este proceso un choque térmico y formaciones de cristales de hielo intracelulares, posicionándose como una alternativa exitosa frente a los métodos de congelación tradicional basados en vapores de nitrógeno líquido (Holt and penfold, 2014; Woods et al., 2004)

Qué efectos genera el vapor de nitrógeno a diferentes tipos de exposición, sobre la motilidad y viabilidad espermática post-descongelación. La fertilidad del semen criogenizado de equinos en términos generales es baja debido a que la selección del semental no se basa en su capacidad reproductiva, si no a su rendimiento en las distintas disciplinas ecuestres (Vidament et al ,1997; Ortega-Ferrusola et al, 2009; Hoffmann et al,2011).



La importancia de la criopreservación del semen está en la facilidad que aporta en el comercio nacional e internacional de los espermatozoides equinos. Esta práctica favorece al control de enfermedades venéreas además de permitir la inseminación de varias yeguas por eyaculado (Peña et al, 2011). La calidad de semen tras la descongelación es menor si se compara al semen fresco o refrigerado, según las estadísticas de la tabla de preñez (Hoffmann et al, 2011).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Este proyecto fue importante ya que el uso de semen congelado es una técnica que evita en gran medida la transmisión de enfermedades venéreas. La criopreservación aumentó la disponibilidad espermática lo que llevó a obtener más pajuelas por eyaculado dando como resultado un número mayor de yeguas inseminadas, además este método facilita el comercio internacional y nacional (Peña et al, 2011).

La investigación se realizó con el objetivo de comparar y discutir los diferentes tipos de congelación seminal siendo uno el tradicional basado en los vapores de nitrógeno y el actual que cuenta con la disponibilidad de bio congeladores para llevar a cabo su fin de criopreservar material genético. También con el propósito de obtener el título de médico veterinario. El estudio tiene viabilidad gracias a que se tiene disposición de diversos buscadores en línea como Google académico, revistas y libros online.

### **3. 3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

- Comparar los dos diferentes tipos de congelación en equinos

#### **3.2 Objetivo específico**

- comparar la congelación tradicional con vapores de nitrógeno y la actual que consiste en el empleo de bio congeladores
- plantear una discusión con relación a los resultados de la bio congelación y los resultados de congelación tradicional en Colombia

### **4. MARCO TEÓRICO**

#### **4.1 Definición Espermatozoide**

Es una célula haploide la cual corresponde al gameto masculino, producido con el fin de realizar la fecundación del óvulo para la formación de un embrión (Marita et al, 2019).

Los espermatozoides son células sexuales correspondientes al género masculino encargadas de la fecundación del óvulo. Posee la mitad de la carga genética, teniendo este el cromosoma responsable de definir el sexo. (Concepto definición, 2019)

El espermatozoide es una célula, la cual transporta un paquete constituido por el genoma nuclear y el centriolo, hasta lograr alcanzar el ovocito. Para que este pueda cumplir su fin, dispone de diversas estructuras especializadas que le garantizan la interacción correspondiente con el tracto genital de la hembra (Salamon y Maxwell, 2000).

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Estos disponen de células germinales en desarrollo que, como fin, constituirán los gametos masculinos. (Hafez y Hafez, 2000)

#### **4.1.1 Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un proceso el cual tiene como fin la producción de espermatozoides, llevándose a cabo en las estructuras anatómicas gonadales masculinas. Este consta de diferentes fases: Fase Espermatogonia la cual se da por una célula madre germinal que sufre procesos de división mitótica. La fase meiótica consiste en las divisiones meióticas y se reduce la información genética a la mitad dando lugar a células llamadas espermátidas. La fase espermiogénesis es la última que se realizará ya que se dará la maduración de las espermátidas dando lugar a espermatozoides maduros. (Manuel y rebeca, 2018)

La espermatogénesis es la formación de espermatozoides, y tiene lugar en túbulos seminíferos los cuales están en los testículos. Para que este proceso sea posible se requiere la presencia de hormonas tales como testosterona, FSH y LH. Alteraciones de esta hormona da lugar a una deficiencia en la producción de espermatozoides. (Instituto Bernabéu, 2016)

La célula germinal masculina se genera en la gónada (testículo), por diversos procesos que permiten la división de estas. Se basa en divisiones meióticas controladas hormonalmente por el eje hipofisario-hipotalámico-gonadal. A partir de cada espermatogonia o célula germinal se originan cuatro espermatozoides haploides que se mantienen unidos por puentes citoplasmáticos y a la vez se encuentran comunicados por células de Sertolli; estas por medio de moléculas señalizadoras, dan lugar a la espermatogénesis favoreciendo el cambio de las espermátidas a espermatozoides. Se identifican 4 fases: fase de Golgi, capuchón, acrosomal y maduración. (Marta Ortiz et al,2006)

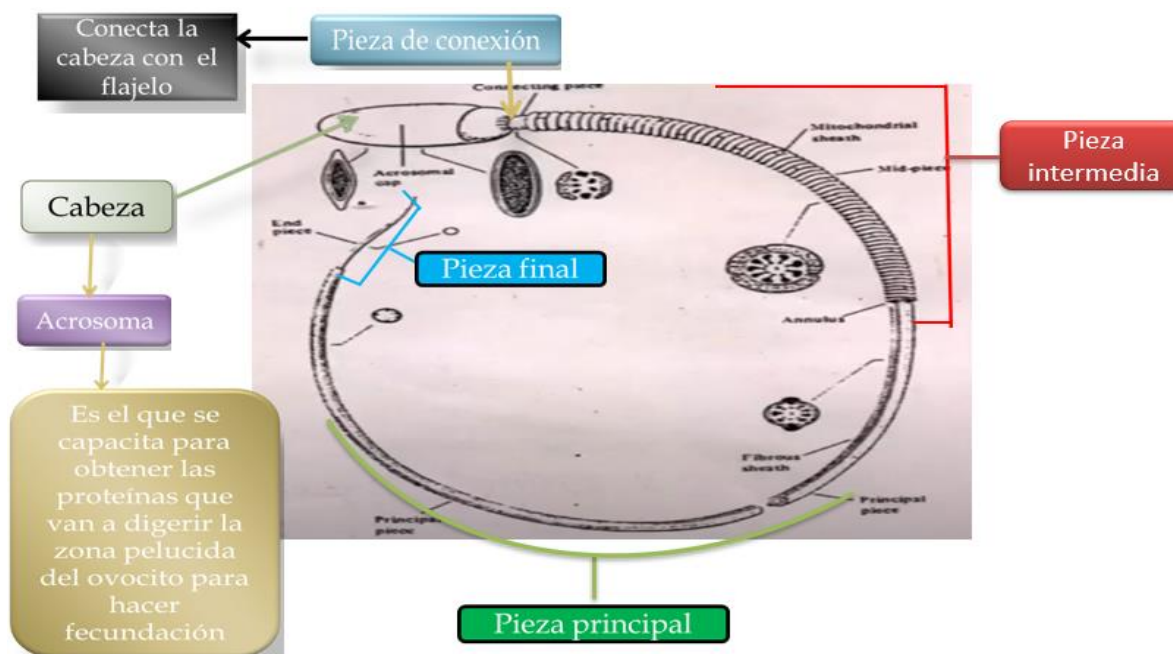
#### 4.1.1.2 Estructura del espermatozoide equino

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y es poseedora de cinco dominios específicamente: Acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y por último la cola. Esto le permite cumplir sus funciones ya que favorecen el reconocimiento y transporte de moléculas, permitiendo que esta célula acople su metabolismo dependiendo del medio circundante, adquiriendo un sistema molecular para reconocer el ovocito. (Jorge rubio et al, 2006)

Toda la estructura del espermatozoide está contenida en la membrana plasmática que se ensancha en áreas específicas y forma el componente más externo de esta célula. (Davis, 1999)

Figura 1

Estructura del espermatozoide equino



DESARROLLO DE UN MÉTODO DE REFERENCIA BASADO EN EL MÉTODO ISAS Y ANÁLISIS DE IMÁGENES PARA LA EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DEL ACROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE (Castillo V., 2012) Modificada por Rodríguez F.

#### 4.1.1.3 Fisiología espermática

Es imprescindible que se dé lugar a 3 procesos fisiológicos espermáticos para que se adquiera la capacidad fértil, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosómica. La maduración del espermatozoide se adquiere durante su recorrido por el epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y ya se llegan a considerar potencialmente fértiles. La capacitación y reacción acrosómica se logra tras la eyaculación dentro del aparato reproductivo de la hembra. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, a diferencia de los espermatozoides eyaculados, los que aún están en el epidídimo no tienen componentes que adquieren del plasma seminal generando modificaciones en sus características estructurales de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994). Estos cambios aportan algunas ventajas con respecto al tiempo empleado para alcanzar la capacitación, de los espermatozoides ubicados en cola del epidídimo sobre aquellos de eyaculado. Estas ventajas se mantienen durante la reacción acrosómica (Macedo et al., 2001)

Capacitación espermática es el proceso del gameto cuando este es eyaculado en el cérvix. Aquí el espermatozoide experimenta un cambio de ambiente, puesto que estaba inmerso en plasma seminal, compuesto por glucosa, colesterol, triglicéridos, etc. Para luego pasar al moco uterino, el cual entre sus diversos compuestos está el calcio y albúmina. Una vez se realiza este cambio la membrana espermática experimenta cambios sobre sus componentes estructurales, dando como resultado más flexibilidad de esta (Yanagimachi, 1994; Gadella., 1999). Esto favorece la unión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal (Avalos Rodríguez et al., 2004).

Una vez la capacitación se complete, los espermatozoides al tener contacto con la zona pelúcida, genera formación de vesículas, lo que genera agujeros permitiendo la liberación de del contenido acrosomal y enzimas encargadas de degradar la zona pelúcida, así el espermatozoide puede llegar hasta el citosol del ovocito fertilizado (Avalos-Rodríguez., 2004).

## **4.2 Fertilidad**

Es la capacidad de lograr la reproducción y depende de diversos factores siendo muy importante la edad y la salud. (Porto y Gardey, 2012)

Es la capacidad para concebir un individuo cuando el espermatozoide se fusiona con un óvulo. (Cuidateplus, 2020)

La fertilidad está asociada a diversos factores que deben ser cumplidos tanto por el macho como por la hembra, para lograr alcanzar el éxito reproductivo. En el caso del macho, debe disponer de la capacidad de producir y eyacular espermia normal. Al referirnos de la hembra debe almacenar y ovular ovocitos óptimos. Además, también debe disponer de un sistema reproductivo favorable con el transporte del espermia, capacitación, fecundación de los ovocitos, desarrollo embrionario y fetal, ya por último la capacidad de dar a luz neonatos sanos. También se debe tener en cuenta que para la fertilidad se presentan procesos claves que permiten generar una descendencia sana y viable para perpetuar la especie de la mejor forma. Entre estos está: Desarrollo de los gametos, fecundación, pre-implantación del embrión, desarrollo fetal post-implantación, nacimiento, crecimiento y desarrollo hasta la madurez sexual (foote, 2003).

Al hablar de fertilidad el equino se considera pobre en este ámbito a comparación de otras especies. Hay factores a los cuales se les atribuye esto, como puede ser por ejemplo: la larga duración gestacional, su marcada estacionalidad reproductiva y su incapacidad para gestar más de un potro (Nagy, 2006; Nath 2011).

### **4.2.1 Motilidad espermática**

Al hablar de motilidad podemos referirnos a 3 tipos de movilidad:

Progresivamente, este le confiere el movimiento que le permite el avance y por tanto recorre las trompas de Falopio alcanzando el óvulo.

No progresiva: no progresan en el avance y se mueven en círculo.

Inmóviles: incapaz de movilizarse de forma progresiva (Trullenque, 2014)

Consiste básicamente en la capacidad de movimiento de los espermatozoides. La motilidad deficiente se entiende por espermatozoides con dificultades en su movimiento de forma correcta lo que podría ser consecuente a una infertilidad. (Cristian, 2020)

#### **4.2.2.2 Reacciones Acrosómica**

El Acrosoma es una vesícula secretora ubicada en la cabeza del espermatozoide. La reacción Acrosómica, es la función de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana Acrosómica Después de la capacitación que se da lugar en el Epidídimo se le confiere a esta célula la habilidad para sufrir el proceso denominado reacción Acrosómica. (María et al, 2007)

La reacción Acrosómica es un proceso que estimula la liberación de diversas enzimas almacenadas en este con el fin de poder penetrar la zona pelúcida. (Cardona, 2005)

#### **4.3 Criopreservación**

Es el empleo de temperaturas entre -80 grados Celsius y -196 grados Celsius con el fin de poder mantener la conservación de células vivas para tenerlas a disposición tras la descongelación (Pronacero, 2020)

La criopreservación permite que las células estén disponibles y pueden ser descongeladas fácilmente para el uso al cual esté dirigido (celvitae, 2020)

Al hablar de la criopreservación del semen se define como una técnica que se desarrolló para satisfacer ciertas necesidades. Más concretamente hablando de la conservación de material genético por un tiempo indefinido y la implementación de la inseminación artificial, representando así un excelente

instrumento para el mejoramiento genético; La disminución de temperatura se utiliza para reducir la actividad metabólica de estas células y así prolongar la vida activa del espermatozoide (Ramón y Landívar, 2013)

El objetivo principal de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular por un periodo prolongado. Para esto se hace uso de temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  ya que a estas se detiene en gran medida los procesos metabólicos (Medeiros,.2002).

#### **4.3.1 Beneficios**

Desde que la técnica de la criopreservación de espermatozoides equinos se implementó se ha facilitado el comercio nacional e internacional, además de que se aportó un mejor control en cuanto a la transmisión de enfermedades venéreas y permite un mayor número de yeguas inseminadas Por eyaculado (Peña et al, 2011).

La criopreservación de semen otorga ventajas en los diversos sistemas de producción, principalmente hablando de los programas de mejoramiento genético (Quinn et al., 1969).

#### **4.3.2 Criopreservación y daño en los espermatozoides**

La calidad del semen congelado es considerablemente menor con respecto al semen fresco o refrigerado. (Hoffmann et al, 2011)

Esto se observa debido a los cambios que experimentan los espermatozoides durante la congelación, lo que provoca una pérdida de la integridad y función de la membrana plasmática. (Parks y Graham, 1992)

Se le confiere esto principalmente a la formación de cristales de hielo y a la apoptosis (Peña et al, 2011)



La criopreservación se establece como una buena herramienta para el mejoramiento genético; Sin embargo, se reportan daños a nivel de las células espermáticas debido a un estrés tóxico y osmótico, causado por la exposición de los crioprotectores y por los choques térmicos que se generan durante la congelación y descongelación. Los daños que se presentan pueden causar repercusiones en motilidad, viabilidad y velocidad espermática viéndose estas disminuidas. Todo esto debido a la dilución de los espermatozoides con las soluciones crioprotectoras, además de las curvas de congelación y descongelación que se presentan, llegando a manifestar alteraciones en la integridad celular entorno a la estructura y funcionalidad (Morisawa, 1994).

La membrana plasmática es la primera estructura en verse afectada por los distintos cambios en la temperatura y composición química del ambiente durante el proceso de crioconservación. (Farkas et al., 2001; Muchlisin et al., 2009)

#### **4.4 Tipos de crioprotectores**

Se posee conocimiento de dos tipos de crioprotectores. De los cuales a uno se le atribuye el nombre de permeables gracias a su capacidad de penetrar la membrana celular ya que son pequeñas moléculas no iónicas siendo las más conocidas el glicerol y el dimetilsulfóxido. En dado caso que los crioprotectores no logren ejercer el efecto deseado o resulten tóxicos, también se puede utilizar dimetilformamida, etilenglicol y metilformamida (sieme et al., 2016; squires et al., 2004)

El otro tipo de crioprotectores son los no permeables que tienen un efecto deshidratante sobre la célula ya que tiene la capacidad de incrementar la osmolaridad en el medio de criopreservación (Oldenhof et al., 2013)

Se sospecha que un elemento usado como crioprotector conocido como glicerol a manifestado efectos tóxicos en el semen equino (squires et al., 2004), se logra apreciar la desnaturalización de las proteínas (Hammerstedt y Graham 1992), se evidencia un mayor estrés osmótico ya que penetra en menor velocidad por ello se prefieren usar otras alternativas para aumentar la fertilidad del semen

congelado (Khlifaoui, 2005), el empleo de dimetilformamida ha demostrado mejores resultados en los parámetros espermáticos pos descongelación en cuanto a relación con el glicerol se refiere (Alvarenga et al., 2005).

Otro método conocido se basa en la implementación de yema de huevo ya que posee la capacidad de inhibir la respiración celular y de esta forma inhibe la motilidad (Kampschmidt et al., 1953) las características crioprotectoras de la yema de huevo son otorgadas por los fosfolípidos y lipoproteínas consideradas de baja densidad cuya función es recubrir la membrana espermática y así reducen los efectos de un choque térmico (Medeiros et al., 2002)

#### **4.5 congelación con vapores de nitrógeno**

Es una biotecnología empleada en la reproducción conocida como método tradicional de congelamiento el cual consiste en el contacto de las pajuelas con los vapores de nitrógeno durante un tiempo determinado y así poder disponer del material genético cuando se requiera (Perez et al., 2018)

El proceso consiste en disponer de las pajillas llenas con semen diluido y colocarlas en posición horizontal sobre gradillas a una distancia de 4 cm sobre el nivel del nitrógeno durante 10 minutos para siguiente a esto sumergirlas directamente en nitrógeno líquido. Después del proceso de congelación la recomendación es transferir las pajillas a tanques de almacenamiento con nitrógeno líquido para su distribución y desplazamiento (Baracaldo et al., 2007)

#### **4.6 congelación de semen con bio congeladores**

Los bio congeladores son equipos con sistemas modulares que tiene la capacidad de regular la temperatura, disponen de una criocámara, un frío baño y un estuche para el transporte. Dichos bio congeladores permiten una precisa y homogénea congelación sobre un número considerable de dosis por unidad de tiempo. Se tiene registro de poder congelar más de 500 dosis seminales asegurando en todas y cada una de ellas las mismas condiciones de congelabilidad (Roca et al 2021)

El biocongelador se emplea para congelar pajillas a velocidades controladas mediante nitrógeno líquido. Dispone de un tanque presurizado de nitrógeno líquido y una unidad de control manipulada a través de un ordenador el cual cuenta con un programa para el manejo del biocongelador. Este debe pasar por un proceso de atemperado de 4 grados centígrados para evitar un choque térmico que afecte la viabilidad espermática y posterior a esto se debe introducir las pajuelas que eran congeladas de 4 grados centígrados a menos 5 grados centígrados manejando una velocidad de menos 4 grados centígrados por minuto (Rosario M ,. 2020)

## **5. Marco metodológico**

En el trabajo presente se realizó diversas investigaciones con el fin de recolectar información bajo los parámetros de la metodología de revisión sistemática, teniendo en cuenta aquellos documentos que permitieran la comparación de los dos tipos de congelación seminal.

Este es un estudio cualitativo bajo la modalidad transversal descriptiva en la cual se usaron fuentes bibliográficas en español, artículos científicos, libros.

### **6.1. Materiales**

1. Libros de reproducción equina online, medicina equina online
2. Buscadores de internet como Google académico
3. Artículos científicos online
4. Literatura gris

### **6.2. Búsqueda y revisión**

Se desempeñó una búsqueda en la literatura con relación a los dos tipos de congelación de material genético equino, se tuvo en cuenta toda la información a la cual se tuvo disponibilidad a través de buscadores online.

#### **6.2.1 Criterios de exclusión bibliográfica**

1. Estudios donde el semen equino se sometiera a cualquiera de los dos tipos de congelación ya sea la tradicional o la actual bajo el uso de bio congeladores.
2. El semen utilizado fuera de ejemplares equinos únicamente.
3. Legibilidad lingüística en los documentos.

## 6. Resultados

Lo que se investigó fue que, en el año 2020 se llevó a cabo un estudio donde el objetivo de este es comparar los resultados post-congelación de material seminal equino por medio de vapores de nitrógeno y descenso controlado de curva por medio del empleo de un espermiograma clásico. Se emplearon pajillas de 0.5 ml para el almacenamiento del semen, estas se estabilizaron por 20 minutos en refrigeración a una temperatura de 5 °C. Posterior a esto se colocarán entre 3 – 6 centímetros por encima del nivel de nitrógeno líquido durante un periodo de tiempo de 15 – 20 minutos y en la congelación del material seminal se procederá a sumergirlo de forma directa en un tanque con una capacidad de 37 – 45 L. Protocolo de Fequundar (equus y Taurus CIENCE, 2016).

Tras la descongelación se procede a la evolución de diversos parámetros como la motilidad total, motilidad progresiva, concentración seminal y número de espermatozoides totales bajo los métodos usados en la congelación seminal. Karla Sonnenholzner Espinosa (2020)

Se investigó un estudio realizado en el año 2017 en Medellín Colombia, con el propósito de evaluar ciertos factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en equinos de la raza criollo colombiano y su relación con la calidad del semen criopreservado. Para esto se procedió a recolectar el semen de 30 equinos y se recuperó el plasma seminal para que posteriormente se hicieran mediciones de componentes tales como proteínas y vitaminas. Luego se sometió el semen al proceso

conocido como criopreservación a lo cual se le adiciono 2 mg/ml de plasma seminal. Post-descongelación se evaluaron distintos parámetros para definir movilidad, cinética, viabilidad, e integridad espermática. Como resultado se logró identificar una relación entre el genotipo CRISP-3 y la calidad del semen equino criopreservado. De igual forma, un nivel elevado de esta proteína en el plasma seminal se asoció con una mayor calidad espermática post-descongelación. Esto ayudó a definir que la composición del plasma seminal resultó ser un factor importante en la calidad del semen criopreservado; igualmente la adición del plasma seminal con relación a su capacidad antioxidante absoluta, demostró tener correlación con la congelabilidad del semen en los equinos. Usuga. (2017)

Se investigó un trabajo el cual se llevó a cabo en el año 2017 en Perú. El trabajo tiene como objetivo evaluar la calidad post-descongelación del semen equino, el cual será sometido a dos esquemas a los cuales se les adiciona dimetilformamida (DMF). Se obtuvo el semen de 5 caballos criollos colombianos, y cada muestra de estos fue diluida en medio de INRA 82 y modificada con los respectivos tratamientos de adición de DMF. Se procedió a él empaquetamiento de él semen en pajillas de 0.5 ml las cuales fueron sometidas a él empleo de vapores de nitrógeno por un periodo de tiempo de 15 min y en una distancia de 6 cm de la superficie. Luego se sumergieron en nitrógeno líquido por 20 segundos y posterior a esto se almacenó durante 10 días en un tanque criogénico. Al pasar diez días se descongeló por 40 segundos en baño maría empleando una temperatura de 37.5 °C. Al realizar el análisis correspondiente a la post-descongelación se buscó evaluar la movilidad y cinética espermática mediante un sistema computarizado determinando la integridad de la membrana plasmática usando la prueba hipoosmótica. Como resultado se logró apreciar una menor reducción de la movilidad y de la cinética espermática gracias a la adición de DMF antes y después de la congelación. En conclusión se determinó que la adición de DMF durante el proceso de criogenización proporciona una mayor protección a los

espermatozoides permitiendo que estos presenten mejor motilidad post descongelación del semen equino. Domingo et al, (2017)

El estudio investigado se realizó en el año 2015. Esta investigación tiene como objetivo reconocer los diversos factores fisiológicos, técnicas de congelación, además de tendencias de investigación con el propósito planteado de incrementar los resultados favorables en el proceso de conservación seminal. Ya obtenida la muestra del eyaculado se procede a la evaluación de las características macro y microscópicas del semen incluyendo motilidad, morfología, concentración y bacteriología. Para realizar esto de forma adecuada todos los materiales que entren en contacto con el semen deben disponer de una temperatura de 37 °C. Se espera que antes de la congelación del semen este represente una morfología normal superior al 40%, una motilidad progresiva superior al 60% y que la concentración sea superior a 100 millones de espermatozoides por ml. Ya realizada la evaluación macroscópica y tratando de cumplir las recomendaciones en la medida de lo posible se procede a realizar la dilución del semen en una proporción 1:1 para poder conservar la integridad de las células lo mejor posible en el transcurso del transporte. Posterior se centrifuga y se le iniciara su respectivo proceso de congelación. Se hace llevando las pajillas a temperaturas de 4 °C hasta -196 °C. Esto se puede obtener al usar vapores de nitrógeno dentro de una caja de icopor. Si estamos empleando un sistema manual, las pajillas se disponen a tres o cuatro cm sobre los vapores de nitrógeno dentro de un periodo de 7 – 10 minutos antes de sumergirlo en nitrógeno líquido. Jefferson Castro Cruz, Liliana Chacón Jaramillo (2015)

Lo que se investigó fue un trabajo que se realizó en el año 2013 Antioquia Colombia. Esta investigación tiene como objetivo comparar la evaluación de la movilidad del semen equino usando métodos convencionales y SCA (CASA). Se obtuvo semen de 3 caballos de la raza criolla colombiano (tres muestras de cada uno) las cuales fueron sometidos a congelación junto con un diluyente (4 % yema de

huevo, 5% dimetilformamida). La movilidad del semen descongelado que presentará sería determinada de forma convencional con microscopio de contraste de fase y usando el software SCA. El resultado obtenido representa promedios de movilidad de  $54,3 \pm 10,1$  y  $61,8 \pm 13,9$ . Se concluye que el análisis del semen equino mediante los métodos convencionales aplicados en la investigación, es equiparable para analizar la movilidad espermática. Restrepo et al. (2013)

Se investigó un estudio realizado en el año 2010 en Bogotá, Colombia. Esta investigación tiene como objetivo lograr determinar nuevas propuestas para la congelación del semen equino, diversos componentes de los diluyentes para la criopreservación y el adecuado metabolismo espermático. Se someten pajillas de 0.5ml a curvas de congelación con vapores de nitrógeno líquido. Las pajillas se colocan en una posición horizontal dentro de una nevera de icopor a una distancia de 4 cm. Estos vapores se encuentran a temperatura de  $-160^{\circ}\text{C}$  lo que da como resultado que en 10 minutos se de una congelación paulatina de las pajillas antes de ser sometidas al empleo de nitrógeno líquido. Janine Wernli (2010)

## **7. Discusión**

Teniendo presente los datos obtenidos en esta investigación sobre los dos tipos diferentes de criopreservación sobre el material genético equino, se puede resaltar que la congelación tradicional a pesar de ser la más usada puede no ser la mejor opción ya que en el proceso de congelación y descongelación seminal predispone a la formación de cristales en las células espermáticas lo que afecta diversos parámetros que benefician la calidad del mismo.

En la actualidad la congelación seminal es la biotecnología más empleada para la criopreservación de material genético. Es un procedimiento orientado en gran medida a minimizar daños celulares que

sufren las células durante la congelación y descongelación. Si estos procesos se llevan a cabo de forma errónea es común evidenciar afectaciones estructurales, químicas además de las funcionales que reducen su viabilidad en gran medida (Maxwell et al., 1993) Los choques térmicos es un problema común que se genera por errores en las prácticas de congelar y descongelar desencadenando de esta manera la formación de cristales de hielo, deshidratación, el aumento de sales y la manifestación de un choque osmótico (Stanic et al., 2000). Estas alteraciones dan lugar frente a cambios de temperatura generadas durante el proceso de criopreservación afectando los orgánulos y membranas de las células espermáticas reduciendo su reacción acrosómica (Bailey et al 2000) A pesar de los diversos avances para mejorar esta biotecnología se estima que solo el 50% de las células espermáticas sobreviven a la congelación y descongelación lo que se traduce es la significativa reducción de la tasa de fertilidad cuando se realiza mediante la inseminación artificial (Watson, 2000; Grotter et al., 2019).

Al referirnos a la congelación de material genético equino mediante el implemento de vapores de nitrógeno o también llamado método tradicional o convencional, es el más usado para congelar semen. Mas, sin embargo, la viabilidad, supervivencia e integridad de sus membranas espermáticas se evidencian disminuidas durante la congelación y descongelación. Esto porque la criopreservación con vapores de nitrógeno dispone de una velocidad de enfriamiento inicial bastante rápida, seguida de una más lenta denominada deceleración (Anel et al., 2003). Esta velocidad de enfriamiento más la deceleración generan en la célula una estimulación eficiente sobre la formación de cristales de hielo ya que desencadena el llamado choque térmico (Hammadeh et al2001). La formación de hielo desencadenada por la velocidad de enfriamiento y la deceleración predispone a la formación de hielo intracelular lo que sugiere que el uso de vapores de nitrógeno para la congelación tradicional no es el idóneo para criopreservar material genético por la manifestación de daño y lesiones criogénicas en las células (Mazur, 1984). Por tal motivo se han posicionado métodos alternativos para la criopreservación como es el empleo de bio congeladores con velocidades controladas y crecientes (Esteso et al., 2018) Los bio congeladores disponen de



velocidades bajas frente a la disipación del calor con el fin de evitar choques de frío que generan la formación de cristales de hielo en la célula espermática dando como resultado un método útil y exitoso como alternativa a la congelación tradicional.

## **8. Conclusiones**

1. La criopreservación es una biotecnología empleada en diversos criaderos equinos ya que brinda la posibilidad de disponer de material genético de sementales considerados eficientes por sus habilidades y desempeño en las funciones para las que se les use mas no por su capacidad reproductiva.
2. La criopreservación que utiliza el método tradicional con vapores de nitrógeno se posiciona como la biotecnología más utilizada gracias a su fácil acceso, mas sin embargo esta manifiesta mayor daño y lesiones criogénicas sobre el material genético debido a su velocidad de enfriamiento y deceleración causando la formación de hielo intracelular que afecta los parámetros deseados en el semen a la hora de inseminar.
3. La criopreservación que emplea los bio congeladores ha mostrado ser una alternativa favorable cuando de criopreservar semen se trata ya que esta cuenta con velocidades que son capaces de disipar calor reduciendo el riesgo el riesgo de choques térmicos que predisponen formaciones de hielo en la célula. Además de permitir una congelación homogénea de bastantes pajillas al tiempo.

## 9. REFERENCIAS

- Anel, L., Alvarez, M., Martinez, F., Garcia, V., Anel, E., Paz, P., (2006) Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
- Aurich, J., (2005). Usos Fisiofarmacológicos de las prostaglandinas – Test Hipoosmótico en el caballo
  - Baracaldo, M. Barth, A. Bertrand, W. (2007) pasos para la congelación de semen
  - Bailey, J. L., Blodeau, J. F., Cormier, N. (2000) Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
  - Cardona, A., (2005). Evaluación de la reacción Acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N – acetilglucosamina.
  - Castro, J Y Chacón, L. (2015) aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: Una revisión desde la congelación espermática ciencias veterinarias.
  - Caballero M y Reus R., (2018). Como se forman los espermatozoides
  - Catena M, y Salvador Z., (2019). Como es el espermatozoide – formación partes y función.
  - Celvitae (2020). Criopreservación
  - Cuídate plus (2020). Fertilidad
  - Sieme,H. Squires,E. Oldenhof,H. Hammerstedt, R. Graham, J. Khlifou, M. Alvarenga,M. Kampschmidt,R. Medeiros,C., (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática, pp 45

- Dickson, D., (1999) Usos Fisiofarmacológicos de las prostaglandinas – Test Hipoosmótico en el caballo
- Domingo, D. Acosta, M. Restrepo, G. Camacho, C. Perez, J., (2017). Congelación de semen equino Bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. pp 2
- Farkas, T. fodor , E. Kitajka ,K. Halver J., (2001) Daños en el espermatozoide durante el proceso de criopreservación
- Foot, R., (2003) Aportación al conocimiento reproductivo en el caballo pura raza español: fertilidad, vitrificación de esperma y monitorización de la gestación
- Garcia, M. Rosales, A. Hernandez, P. Reyes, C. Reyes, A., (2001) recolección y manipulación seminal
- Gadella, B., (1999) recolección y manipulación seminal
- Hoffmann, N. Oldenhof, M. Morandini, C. Rohn, K. Sieme, H., (2011). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamid
- Holt, W., Medrano, A., Thurston, M., Watson, P., (2005) Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
- Estes, M., Toledano, A., Castaño, C., Pradiee, J., Santiago, M., (2018) Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
- E Hafez y B Hafez., (2000) Análisis demográfico y caracterización seminal del caballo de las retuertas de Doñana. pp50
- Instituto Bernabéu Medicina reproductiva (2016). Que es espermatogénesis octubre 2016
- Maxwell , W., Evans, G., Rhodes,s., Hillar, M., Bindon, B. (1993). Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación en inseminación artificial a tiempo fijo

- Mazur, p., (1984) ). Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
- Morisawa, M., (1994). Daños en el espermatozoide durante el proceso de criopreservación
- Medeiros, C., (2002) Evaluacion de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación del semen bovino
- Muchlisin, Z. Azizah, M. Muratori, M. Piomboni, P. Baldi, E. Filimberti, E. Pecchioli, P. Mpretti, E. Gambera, L. Baccetti, B. Forti, G. Maggi, M., (2009). Daños en el espermatozoide durante el proceso de criopreservación
- Nagy, R., (2006) Aportación al conocimiento reproductivo en el caballo pura raza español: fertilidad, vitrificación de esperma y monitorización de la gestación
- Nath, L., (2011) Aportación al conocimiento reproductivo en el caballo pura raza español: fertilidad, vitrificación de esperma y monitorización de la gestación
- Ortiz, M. Ruiz, T. Tarazona, A. y Giraldo, C.,. (2006). El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización
- Parks, J. Graham, J.,. (1992). Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamid
- Peña, F. García, M. Samper, J. Aparicio, I. Tapia, J. Ortega C.,(2011). Recolección y manipulación seminal
- Porto, J y Gardey A.,. (2012),. Definición de Actualizado el 2014.
- Quinn, p. White, I. y cleand., (1969) Aportación al conocimiento reproductivo en el caballo pura raza español: fertilidad, vitrificación de esperma y monitorización de la gestación

- Rodríguez, A. Ortiz, M. Ortega, C. Vergara, M. Garcia, A., (2004) Recolección y manipulación seminal
- Rubio, J. Quintero, A. González, D., (2009) Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros
- Ramón, J y Landivar, S., (2013) Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación del semen bovino
- Revista reproducción (2019),. reproducción asistida ORG.
- Revista reproducción asistida ORG., (2014). Fases de la espermatogénesis septiembre 2018.
- Restrepo, G. Ocampo, D. y Velázquez, A., (2013). Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase
- Salamon, S y Maxwell C., (2000) Análisis demográfico y caracterización seminal del caballo de las retuertas de Doñana. pp50
- Sonnenholzner, K., (2020) Evaluación de los resultados de congelación de semen equino con vapores de nitrógeno líquido vs congelación con descenso controlado de temperatura
- Stanic, P., Tandare, M., Sonicki, Z., Simunic, V., Radakovic, B., Suchanek, E. (2000) Optimización de la criopreservación de espermatozoides para su aplicación n inseminación artificial a tiempo fijo
- Trullenque, M., (2014). Interpretar un seminograma. Octubre 2014.
- Therapeutics Pronacera., (2020). Era de la criopreservación

- Úsuga, A,. (2017). Factores genéticos y componentes bioquímicos del plasma seminal en el caballo criollo colombiano y su relación con la calidad de semen criopreservado.
- Wernli, J,. (2010) Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes
- Yanagimachi, R,. (1994). Recolección y manipulación seminal. pp10 - 12