UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE

POSGRADO

MAESTRÍA CIENCIA VETERINARIAS

COHORTE I

MODALIDAD DE TITULACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA

Evaluación de la viabilidad de semen equino crio preservado mediante el uso de diferentes métodos de eliminación de plasma seminal.

AUTOR:

Claudio Efrain Pilataxi Miñarcaja

TUTOR:

Carlos Andrés Mancheno Herrera

GUARANDA-ECUADOR

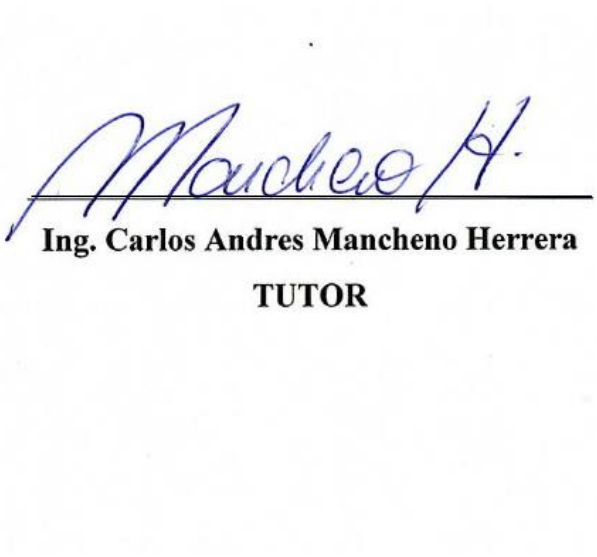
2025

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, Ing. Carlos Andres Mancheno Herrera, en calidad de tutor del trabajo de investigación titulado “Evaluación de la viabilidad de semen equino crio preservado mediante el uso de diferentes métodos de eliminación de plasma seminal”, presentado por el maestrante Claudio Efrain Pilataxi Miñarcaja, certifico que dicho trabajo cumple con los requisitos metodológicos, académicos y científicos establecidos por la Universidad Estatal de Bolívar.

En virtud de lo expuesto, autorizo la presentación del presente trabajo de titulación para su correspondiente evaluación y sustentación ante el tribunal designado.

En la ciudad de Guaranda, a los 29 días del mes de agosto del año 2025.



Ing. Carlos Andres Mancheno Herrera
TUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Yo, Claudio Efrain Pilataxi Miñarcaja portador de la Cédula de Identidad No 0604837781 en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del Trabajo de Titulación: "EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE SEMEN EQUINO CRIO PRESERVADO MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE PLASMA SEMINAL", modalidad trabajo de investigación, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, concedemos a favor de la Universidad Estatal de Bolívar, una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar, para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Digital, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.



Claudio Efrain Pilataxi Miñarcaja
0604837781

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, por su amor incondicional, apoyo constante y por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. A mis docentes, por compartir su conocimiento y guiarme a lo largo de mi formación académica. Y a todos aquellos que creyeron en mí, incluso cuando yo dudé.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por darme la fortaleza y sabiduría necesarias para culminar esta etapa de mi vida. A mis padres, por su sacrificio y amor incondicional. A mis amigos y compañeros, por su apoyo y palabras de aliento. A mis docentes y asesores, por su guía, paciencia y valiosos conocimientos compartidos durante este proceso académico.

ÍNDICE

RESUMEN IX
ABSTRACT X
INTRODUCCIÓN XI
CAPÍTULO I: PROBLEMA 1
1.1. Planteamiento del problema: 1
1.2. Formulación del problema: 2
1.3. Justificación 3
1.4. Objetivos: 4
Objetivo General 4
Objetivos Específicos 4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 5
2.1. Antecedentes Investigativos 5
2.2. Fundamentación teórica 10
2.2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo 10
2.2.2. Observación de la libido y de la capacidad de monta 14
2.2.3. Endocrinología reproductiva del macho 15
2.2.4. Vagina artificial 16
2.2.5. Colección del semen 17
2.2.6. Semen equino 17
2.2.7. Manejo del semen post extracción y almacenamiento 19
2.2.8. Dilución y centrifugación 21
2.2.9. Tipos de diluyentes para semen equino 22
2.2.10. Manejo de la centrifugación en semen equino 22
2.2.11. La crio preservación 23
2.2.12. Sperm Filter 24
2.2.13. Integridad de la cromatina espermática 25
2.2.14. Métodos para la detección de daño en el ADN de espermatozoides 26
2.2.15. Evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA 27
2.2.16. Uso de la fluorescencia en evaluación espermática 27
2.2.17. Estrés oxidativo en espermatozoides equinos. 28
2.2.18. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) 29
2.2.19. ¿Cómo evitar el estrés oxidativo en espermatozoides equinos? 29
2.2.20. La naranja de acridina en la evaluación espermática 30
2.2.21. La cromatina en espermatozoides equinos y su relación con la fertilidad 31
2.3. Hipótesis o ideas a defender 35
2.4. Variables 36

2.5. Operacionalización de variables 37
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO 38
3.1. Tipo, nivel y métodos de investigación 38
3.2. Localización y duración del experimento 38
Población y muestra 38
3.3. Técnica de recolección de información 39
3.3.1. Método de colecta 39
3.3.2. Evaluación de semen fresco 39
3.3.3. Métodos de eliminación de plasma seminal 40
3.3.4. Crio preservación 42
3.3.5. Valoración de variables experimentales 42
3.4. Materiales y equipos 45
Materiales: 45
Equipos: 45
Reactivos: 45
3.5. Técnicas de procesamiento, análisis y presentación de datos 46
3.5.1. Tratamiento y diseño experimental. 46
3.5.2. Esquema del experimento. 46
3.5.3. Análisis estadístico y pruebas de significancia 47
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTEPRETACIÓN DE RESULTADOS 48
4.1. Análisis de variables pre congelación 48
4.1.1. Motilidad% 48
4.1.2. Viabilidad, % 49
4.1.3. Concentración espermática 50
4.1.4. Morfo anomalías, %. 51
4.1.5. Integridad de la membrana plasmática, % 52
4.1.6. Integridad de la cromatina, % 53
4.2. Análisis de variables post congelación 55
4.2.1. Motilidad, % 55
4.2.2. Viabilidad, % 56
4.2.3. Integridad de la membrana plasmática, % 58
4.2.4. Integridad de la cromatina 59
4.3. Comprobación de hipótesis o ideas a defender 60
CONCLUSIONES 62
RECOMENDACIONES 63
ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1Métodos para la detección de daño en el ADN de espermatozoides..... 26
Tabla 2Variables Independientes a ser medidas..... 37
Tabla 3 Variables dependientes a ser medidas. 37
Tabla 4 Información climática de la ciudad de Riobamba. 38
Tabla 5 Vari Variables macroscópicas del eyaculado fresco 39
Tabla 6 Variables microscópicas del eyaculado fresco. 40
Tabla 7 Promedio de variables microscópicas post filtración. 41
Tabla 8 Promedio de variables microscópicas post centrifugación. 41
Tabla 9 Promedio de variables microscópicas post congelación. 42
Tabla 10 Esquema del experimento..... 46
Tabla 11 Promedios de variables evaluadas pre congelación y sus grados de significancia. 61
Tabla 12 Promedios de variables evaluadas post congelación y sus grados de significancia. 61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modo de uso del Spermfilter..... 40
Figura 2 Motilidad pre congelación 48
Figura 3 Viabilidad espermática pre congelación. 49
Figura 4 Concentración espermática pre congelación..... 50
Figura 5 Morfo anomalías pre congelación..... 51
Figura 6 Integridad de la membrana plasmática pre congelación 52
Figura 7 Integridad de la cromatina pre congelación 54
Figura 8 Motilidad espermática post congelación..... 55
Figura 9 Viabilidad espermática post congelación..... 57
Figura 10 Integridad de la membrana plasmática post congelación..... 58
Figura 11 Integridad de la cromatina post congelación..... 59

RESUMEN

La criopreservación de semen equino es una herramienta esencial para la conservación genética y el mejoramiento reproductivo de esta especie. Sin embargo, este proceso puede comprometer la viabilidad espermática, especialmente cuando los espermatozoides se exponen prolongadamente al plasma seminal, el cual contiene compuestos que afectan negativamente a la supervivencia de células y su capacidad fecundante.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la viabilidad del semen equino criopreservado mediante el uso de dos métodos de eliminación de plasma seminal: centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos y SpermFilter. Para ello, se colectaron muestras seminales de un semental de raza española, las cuales fueron procesadas bajo ambos métodos y posteriormente se evaluaron antes y después de la criopreservación en parámetros de calidad como concentración espermática, motilidad post-descongelación, morfoanomalías, integridad de membrana e integridad de la cromatina espermática**,** esta última mediante tinción con naranja de acridina y utilizando el equipo contador de células de fluorescencia dual LUNA-FL™.

Los datos recolectados se compararon bajo pruebas estadísticas de t studen y wilcoxon para muestras independientes, los resultados evidenciaron que, aunque la centrifugación produjo una mayor concentración espermática, el uso de SpermFilter se asoció con una menor incidencia de anomalías morfológicas, mayor integridad de membrana y mejor preservación de la cromatina. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$), indicando que el filtrado resulta menos agresivo para la estructura espermática.

Palabras claves: Sperm Filter, centrifugación, plasma seminal, cromatina, naranja de acridina, fluorescencia.

ABSTRACT

Equine semen cryopreservation is a fundamental tool for genetic preservation and reproductive improvement in this species. However, this process can compromise sperm viability, particularly when spermatozoa remain exposed to seminal plasma for prolonged periods, as it contains compounds that negatively affect cell survival and fertilizing capacity.

This study aimed to evaluate the viability of cryopreserved equine semen using two methods of seminal plasma removal: centrifugation (1000 rpm for 10 minutes) and filtration with SpermFilter. Semen samples were collected from a Spanish stallion and processed using both methods. Pre- and post-cryopreservation assessments were conducted to evaluate sperm concentration, post-thaw motility, morphological abnormalities, plasma membrane integrity, and chromatin integrity, the latter determined using acridine orange staining and the LUNA-FL™ dual fluorescence cell counter.

Data were analyzed using Student's *t*-test and the Wilcoxon test for independent samples. The results showed that although centrifugation yielded a higher sperm concentration, the use of SpermFilter was associated with a lower incidence of morphological abnormalities, better membrane integrity, and greater chromatin preservation. These differences were statistically significant ($P < 0.05$), indicating that filtration is a less aggressive method for maintaining sperm structural integrity.

Keywords: SpermFilter, centrifugation, seminal plasma, chromatin, acridine orange, fluorescence.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen equino es una herramienta esencial en los programas modernos de reproducción asistida, que permite conservar el material genético de sementales valiosos y ampliar el acceso geográfico de los programas de inseminación artificial, favoreciendo el intercambio genético tanto a nivel nacional como internacional. Sin embargo, la viabilidad post-descongelación se ve mermada por daños provocados durante el procesamiento, la congelación y la descongelación del semen (Pasch, 2024).

La presencia prolongada del plasma seminal puede afectar negativamente parámetros críticos como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática y la habilidad de los espermatozoides para fertilizar, debido a la acción de proteínas y compuestos presentes en esta fracción (Smith et al.,2025). Por ello, para maximizar la supervivencia espermática, es común eliminar el plasma seminal antes de la crio-preservación.

El método tradicional de centrifugación suele emplearse para separar el plasma, pero este puede generar estrés mecánico y pérdida de espermatozoides (González-Castro et al., 2024). Como alternativa, se ha desarrollado un filtro de membrana sintética hidrófila, conocido como SpermFilter®, que separa el plasma basado en la tensión superficial. Este método ha demostrado ser igual de eficiente que la centrifugación en términos de parámetros cinéticos y de integridad de membrana, y además ofrece una mayor recuperación de espermatozoides (Smith et al.,2025).

En respuesta a estas limitaciones, se ha desarrollado el SpermFilter, una alternativa innovadora y menos invasiva basada en una membrana sintética hidrófila que separa el plasma seminal mediante tensión superficial, ofreciendo una mayor recuperación de espermatozoides y reduciendo el daño estructural (Smith et al.,2025).

Dado este contexto, el presente estudio tiene como objetivo comparar los efectos de la centrifugación y del SpermFilter® sobre la viabilidad del semen equino criopreservado, evaluando parámetros como concentración espermática, motilidad, morfoanomalías, integridad de membrana e integridad de la cromatina.

CAPÍTULO I: PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema:

La crio preservación del semen equino obtenido mediante vagina artificial puede comprometer la calidad y viabilidad espermática, especialmente cuando el plasma seminal está presente durante procesos prolongados. En condiciones de monta natural, la exposición se reduce, lo cual minimiza los efectos adversos que dicho plasma puede tener sobre los espermatozoides. Aunque el plasma seminal aporta beneficios fisiológicos, como la modulación inmunitaria en un útero inflamado, su exposición extendida antes de la criopreservación ha demostrado disminuir la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida y sufrir capacitación, reduciendo su potencial fertilizante (Al-Essawe et al., 2018). A pesar de las ventajas teóricas, el conocimiento acerca de métodos menos invasivos de eliminación del plasma seminal como los filtros basados en membranas sigue siendo limitado en estudios comparativos. Existen tecnologías innovadoras, como sistemas de microfiltración que simulan el proceso biofisiológico, mejorando parámetros de viabilidad, motilidad y fragmentación del ADN sin necesidad de centrifugación mecánica (Medica et al.,2024).

1.2.Formulación del problema:

¿Cómo influyen los métodos de eliminación de plasma seminal (centrifugación, SpermFilter) sobre la viabilidad de los espermatozoides para procesos de crio preservación en caballo de la raza español, ubicado en el cantón Riobamba en los predios y laboratorio de Biotecnología animal de la ESPOCH en el año 2024?

1.3.Justificación

La criopreservación del semen equino es una herramienta clave en la biotecnología reproductiva moderna, permitiendo la conservación del material genético de sementales de alto valor y facilitando el intercambio genético a nivel nacional e internacional. No obstante, uno de los principales desafíos de este proceso radica en el daño estructural y funcional que pueden sufrir los espermatozoides durante la congelación y descongelación, especialmente cuando permanecen expuestos al plasma seminal por tiempos prolongados.

El plasma seminal contiene compuestos bioquímicos que, si bien cumplen funciones importantes en el entorno fisiológico natural, pueden afectar negativamente la viabilidad espermática en condiciones de manipulación in vitro, reduciendo parámetros como motilidad, integridad de la membrana plasmática y estabilidad de la cromatina. Por ello, se vuelve esencial aplicar métodos eficaces para su eliminación antes de la criopreservación.

Tradicionalmente, la centrifugación ha sido el método más utilizado para este fin; sin embargo, diversos estudios han señalado que esta técnica puede inducir daños mecánicos a los espermatozoides, comprometiendo su integridad estructural y funcional. En respuesta a esta limitación, han surgido alternativas como el SpermFilter, un dispositivo de filtración por membrana que ofrece una opción menos agresiva para separar el plasma seminal.

En este contexto, la presente investigación se justifica por la necesidad de comparar ambos métodos con un enfoque técnico y científico, a fin de identificar cuál de ellos preserva de mejor manera la calidad espermática durante y después del proceso de congelación. Esta comparación permitirá optimizar los protocolos de criopreservación y contribuir al desarrollo de prácticas reproductivas más eficientes en la industria equina, mejorando así la rentabilidad y sostenibilidad de los programas de reproducción asistida.

1.4.Objetivos:

Objetivo General

- Evaluar la viabilidad de semen equino crio preservado mediante el uso de diferentes métodos de eliminación de plasma seminal.

Objetivos Específicos

- Utilizar Spermfilter y la centrifugación como métodos de eliminación del plasma seminal en equinos para crio preservación.
- Valorar la capacidad de recuperación de espermatozoides con el uso de Spermfilter y la centrifugación para la eliminación de plasma seminal.
- Evaluar daños en la estructura espermática tras la eliminación del plasma seminal en pre y post congelación.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. *Efecto de la eliminación del plasma seminal mediante un filtro de esperma sobre la viabilidad de Semen de Semental Refrigerado*

El enfriamiento del semen equino obtenido de algunos sementales da como resultado una menor calidad seminal y viabilidad cuando el plasma seminal (SP) está presente. En este estudio se evaluó el efecto de la eliminación de SP utilizando un filtro de esperma sobre la viabilidad del semen refrigerado de semental. Se utilizaron 31 sementales. Sus eyaculaciones fueron divididas en tres grupos: CN, el semen fue diluido con diluyente; FLT, SP fue eliminado por filtración; y CT, SP se eliminó mediante centrifugación y se enfrió a 15 °C durante 24 horas. La motilidad total y la integridad de la membrana plasmática se evaluaron inmediatamente después recolección (T0) y después de 24 horas de refrigeración (T1) (Ramires, 2013).

No se observaron diferencias (P > 0,05) en T1 para la motilidad total de los espermatozoides (TM), la motilidad progresiva de los espermatozoides o la membrana plasmática integridad cuando se analizaron muestras de semen de todos los sementales. Sin embargo, cuando Se analizaron muestras de sementales denominados “malos enfriadores” (TM ¼ <30% en T1). Se observó una diferencia en la TM y la motilidad progresiva de los espermatozoides para CN en comparación con FLT y CT en T1. La recuperación de espermatozoides fue mayor cuando se eliminó SP usando el filtro (FLT) a eso cuando el SP se eliminó por centrifugación (CN) (89% vs. 81%). Así, se concluyó que filtrar con un filtro de esperma es un método eficiente y práctico para eliminación de SP de eyaculados de sementales, con menor pérdida de esperma que la centrifugación (Ramires, 2013).

2.1.2. *Evaluación de dos diluyentes comerciales botucrio® e inra96 mediante el proceso de crio preservación de células espermáticas en caballos arabe y criollo de 4 a 5 años – en la provincia de Cotopaxi cantón Latacunga*

La investigación se llevó a cabo con el fin evaluar la crio preservación de semen equino en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, sector Salache Bajo, en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos

Naturales, con el objetivo de evaluar los caracteres espermáticos pos descongelación con el uso de dos diluyentes Botucrio® e INRA96 para la conservación y preservación de semen equino de 4 donantes entre estos de razas criollas y árabes, se procedió a una dilución seminal de 1 ml en 1 ml con diluyente (Botucrio®) e (INRA 96) como crio conservante, con una valoración inicial de color, olor, ph, aspecto, motilidad en masa, motilidad individual, morfología, concentración espermática, espermatozoides vivos y muertos, usando como base la técnica de empaquetamiento con pajillas equinas, con la adecuación de las pajuelas a gradientes de temperatura hasta llegar a -196°C la misma que corresponde al medio de conservación, valores espermáticos pos descongelación, sus variables con relación a la muestra inicial. Obteniendo un nivel de integridad favorable pre y pos congelación sin deformación estructural de las características del semen. Obteniendo una viabilidad del esperma del 80% de promedio en lo que conlleva al caballo árabe teniendo este una mejor valoración de estructura seminal dentro de los parámetros de pos descongelación valorados por el investigador y su equipo de trabajo (Garzón, 2023).

2.1.3. *Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino*

La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de semen, presenta como limitantes ser un compuesto de origen animal y un potencial riesgo de contaminación. Debe ser procesada al momento de su utilización y al poseer gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, interfiere con la evaluación del semen. El objetivo de este trabajo fue probar si el medio AndroMed®, a base de lecitina de soja, es efectivo para congelar semen equino. Los eyaculados se diluyeron con: 1) yema de huevo y dimetilformamida; 2) yema de huevo, dimetilformamida y glicerol; 3) AndroMed®; 4) AndroMed® suplementado con dimetilformamida. Se evaluaron los parámetros cinemáticos, la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides posdescongelado. La movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. De igual manera los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. Como conclusión, en las condiciones experimentales descriptas, el diluyente AndroMed® no evidenció ventajas cuantitativas comparado con otro diluyente convencional respecto a la capacidad de congelar semen equino con parámetros mínimos de aceptación in vitro (Caldevilla, 2020).

2.1.4. *Evaluación de 3 protocolos de crioconservación de semen equino Anglo Arabe y Pura Sangre Inglés (psi) en la Estación Experimental Tunshi de la Espoch*

Se evaluó tres protocolos de crioconservación de semen equino en las razas Anglo Árabe y Pura Sangre Inglés en la Estación Experimental Tunshi de la ESPOCH. Los protocolos variaron en tiempos y fuerzas G en la centrifugación previa a la crioconservación (15min - 2000 RPM; 20min - 1500 RPM; 25min-1000 RPM). Se emplearon los diluyentes comerciales RAMP PLUS para la centrifugación y CRIO RAMP para la crioconservación según las recomendaciones del fabricante (León, 2023).

La evaluación incluyó características del semen fresco y post congelación para determinar la eficiencia de cada tratamiento. Utilizando una curva de congelación, el semen se enfrió a 4 grados Celsius durante 4 horas y luego se congeló en vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos. Se evaluaron 10 unidades experimentales por tratamiento y raza, totalizando 180 unidades experimentales en tres extracciones de semen. Los resultados del semen fresco se analizaron con un diseño de bloques completos al azar, asignando cada bloque a los machos utilizados. Para el semen post congelación, se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio de factores, siendo el factor A los tiempos y fuerzas G en la centrifugación y el factor B la línea genética equina (León, 2023).

La interpretación de resultados se realizó con el software estadístico InfoStat versión 2021, utilizando análisis de estadística descriptiva, ADEVA y separación de medias. Los mejores resultados se observaron con el T3 (25min - 1000 RPM), con una motilidad individual del 61,75% y una integridad de la membrana espermática del 50,07%. Se concluyó que el protocolo más eficaz para la crioconservación de semen equino es el T3, desaconsejando el T1 (15min - 2000 RPM) debido a sus resultados más bajos en motilidad e integridad de la membrana espermática (León, 2023).

2.1.5. *Evaluación de la calidad seminal en equinos de raza criollo colombiano con tres diluyentes comerciales*

En este estudio se pone a prueba tres conservantes o diluyentes para semen equino los cuales son Botusemen Gold de laboratorio BotuPharma® Brasil, Ramp de laboratorio Rampco® Colombia y Revolution de Incolamerica® Estados unidos, en tres individuos con condiciones anatómicas y fisiológicas similares de los cuales las muestras se preparan

mediante una dilución 1/1 y posteriormente se evalúan características iniciales como el color, pH, malformaciones espermáticas seguido de la evaluación mediante el uso de la cámara de neubauer para determinar el porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva en un control inicial de doce horas seguido de controles en intervalos de veinticuatro horas, almacenándolos en un medio de 2-8° con el fin de determinar y analizar que producto es mejor o conserva las mejores características bajo estas condiciones y por qué Serrano (Chagüeza, 2024).

2.1.6. *El gradiente de densidad coloidal Equipure™ se utilizó antes y después de la crio preservación de semen equino congelado*

El objetivo del trabajo fue verificar la calidad del esperma luego de utilizar un protocolo EquiPureTM modificado antes y después de la criopreservación de semen equino. En el experimento 1, se utilizaron colecciones de 15 sementales (n=26). Se formaron cuatro grupos experimentales: Control (centrifugación convencional); EG (centrifugación con EquiPureTM antes de congelar); CT+EG (centrifugación con EquiPureTM después de descongelar el semen); EG+EG (centrifugación con EquiPureTM antes y después de congelar el semen). En el experimento 2 se realizaron pruebas de fertilidad con los grupos experimentales: control (centrifugación convencional); EG (centrifugación con EquiPureTM antes de congelar); CT+EG (centrifugación con EquiPureTM después de descongelar el semen); EG+EG (centrifugación con EquiPureTM antes y después de congelar el semen) utilizando cuatro ciclos de 8 yeguas (n=32) y un semental considerado "Mala congelación". Las inseminaciones se realizaron después de la ovulación, mediante depósito profundo de semen en el cuerno uterino ipsilateral al lado de la ovulación. Para las inseminaciones, se descongelaron ocho pajitas en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos con una concentración de 100 millones de espermatozoides por pajita. Los grupos CT y EG tenían una dosis fija de 800 millones de espermatozoides. La dosis de inseminación de los grupos CT+EG y EG+EG dependió de la recuperación del esperma post-centrifugación (v:v) después de la descongelación con EquiPureTM. Los parámetros espermáticos analizados fueron la cinética espermática (motilidad total, progresiva y espermatozoides rápidos) mediante análisis computarizado del movimiento de los espermatozoides y la estabilidad de la membrana plasmática, la generación mitocondrial de O2, el potencial mitocondrial y la peroxidación lipídica mediante citometría de flujo (Pereira, 2023).

Los análisis de esperma de los grupos Control y EG se analizaron inmediatamente después de descongelarlos a 37ºC durante 30 segundos (M0). Los grupos CT+EG y EG+EG se analizaron inmediatamente después del procedimiento de centrifugación (M0). Todos los grupos fueron analizados post-incubación a 37ºC durante 60 minutos (M60). En M0 (P<0,05) el grupo EG+EG aumentó la motilidad total, la motilidad progresiva, la motilidad rápida, el potencial de membrana mitocondrial y la estabilidad de la membrana plasmática en comparación con los otros grupos evaluados; El grupo CT+EG aumentó los parámetros rápidos, la estabilidad de la membrana plasmática, el potencial de membrana mitocondrial y disminuyó la producción de anión superóxido, en relación con los grupos control y EG. Después de la incubación a 37ºC durante 60 minutos (M60), el grupo EG+EG aumentó la motilidad total y los parámetros de motilidad progresiva, el potencial de membrana mitocondrial alto y rápido y disminuyó la producción de O 2 en comparación con otros grupos. El grupo EG se diferenciaba del grupo control en la motilidad progresiva y la rapidez de los espermatozoides. El grupo CT+EG se diferenciaba del control en la motilidad total y progresiva, la motilidad rápida y la peroxidación lipídica. El grupo CT+EG se diferenciaba del EG en la motilidad progresiva y los espermatozoides rápidos. El control, EG y CT+EG no difirieron en relación con el alto potencial de membrana mitocondrial y la producción de O2. Los grupos no difirieron en la estabilidad de la membrana plasmática. Las tasas de recuperación de esperma fueron menores en los grupos CT+EG y EG+EG (34,9±2,2; 30,1±1,5, respectivamente). La tasa de fertilidad por ciclo fue mayor en el grupo EG+EG (62,5%, 5/8) en comparación con los otros grupos CT, EG, CT+EG (25% 2/8; 25% 2/8; 25% 2 /8, respectivamente) los otros grupos evaluados no tuvieron diferencias. Se concluyó que el uso de EquiPureTM aumenta la cinética espermática post-descongelación del semen equino, y que la selección de espermatozoides antes de la criopreservación y post-descongelación puede aumentar la tasa de preñez de sementales considerados “mala congelación” (Pereira, 2023).

2.1.7. *La sericina mejora el estado de capacitación y la integridad de la cromatina de los espermatozoides de semental congelados-descongelados al reducir el estrés oxidativo.*

En el proceso de criopreservación de espermatozoides, además de la criolesión, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) puede afectar negativamente la integridad de la cromatina y las membranas celulares (Heidari Nasirabadi et al., 2019).

La adición de antioxidantes naturales al medio de congelación es una estrategia para reducir los efectos destructivos de las ERO en los espermatozoides. En este estudio, durante 60mín.Tras el proceso de enfriamiento, los eyaculados de cinco sementales se diluyeron en los siguientes medios: medio INRA 82 como Control (C), medio INRA 82 suplementado con 0,25% de Sericina (S), medio INRA 82 suplementado con 1,5 mMGlutatión (G) y medio INRA 82 suplementado con 0,25% de sericina+1,5mM Glutatión (S+G). En el grupo suplementado con sericina congelada/descongelada, si bien la integridad del ADN y la actividad de la catalasa y el glutatión peroxidasa (GPx) aumentaron, la peroxidación lipídica y la normalidad de la pieza media disminuyeron, en comparación con otros grupos ($p < 0,05$). La proporción de espermatozoides con cabeza anormal en el grupo S y de espermatozoides con gota distal en los grupos G y S+G disminuyó, en comparación con el grupo C ($p < 0,05$). En el ensayo de CTC, el porcentaje de espermatozoides capacitados en los grupos de tratamiento fue menor que en el grupo control ($p < 0,01$). En conclusión, la presencia de sericina en el medio de congelación del semen de semental podría mejorar la integridad del ADN del esperma y su resistencia a las ROS y a la peroxidación lipídica (Heidari Nasirabadi et al., 2019).

2.2. Fundamentación teórica

2.2.1. *Anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo*

2.2.1.1. *Testículos*

Los testículos son las gónadas masculinas responsables de la producción de espermatozoides y hormonas sexuales como la testosterona. En el semental, se localizan en la región prepubiana dentro del escroto, una evaginación cutánea y fascial que constituye un divertículo del abdomen, diseñado para mantener la temperatura adecuada para la espermatogénesis (Pasch, 2024). Tienen forma ovoide, con un eje longitudinal mayor que el transversal, y presentan dos superficies, dos bordes y dos extremidades. Durante la vida fetal se sitúan en la cavidad abdominal, cerca de los mesonefros, descendiendo al escroto alrededor del nacimiento (González-Castro et al., 2024). En un semental adulto, cada testículo mide aproximadamente 10–12 cm de largo, 6–7 cm de alto y 5 cm de ancho, con un peso de 225–300 g, aunque su tamaño varía con la edad, la raza, la época del año y las características individuales (Orsolini et al., 2021).

La actividad testicular presenta variaciones estacionales: aumenta durante el fotoperiodo largo, alcanzando su máximo volumen y concentraciones más altas de testosterona circulante. A partir de agosto, la actividad disminuye gradualmente, aunque la producción espermática no cesa en ningún momento del año, lo que permite que los sementales se mantengan fértiles de forma continua (Pasch, 2024).

Cada testículo está envuelto por la túnica vaginal, una extensión del peritoneo adquirida durante el descenso testicular. La capa más externa es la túnica albugínea, una membrana blanquecina de tejido conectivo denso que envuelve y da soporte a la gónada. Por debajo se encuentra el parénquima testicular, de color amarillento, subdividido en lóbulos por tabiques incompletos de tejido conectivo. Estos lóbulos contienen los túbulos seminíferos, que representan aproximadamente el 80 % del peso testicular y constituyen el sitio de la espermatogénesis (Peña, 2024).

La producción espermática está regulada por la hormona foliculoestimulante (FSH), que estimula a las células de Sertoli para secretar proteína fijadora de andrógenos (ABP) e inhibina. Entre los túbulos seminíferos, en el intersticio, se encuentran las células de Leydig, responsables de la síntesis de testosterona y otros andrógenos bajo la acción de la hormona luteinizante (LH). La testosterona es esencial para el desarrollo de las características sexuales secundarias, el comportamiento reproductivo y el mantenimiento del espermatogénesis (Orsolini et al., 2021).

2.2.1.2. *Epidídimo*

El epidídimo es el primer conducto excretor que recibe los espermatozoides desde los conductos eferentes del testículo. Está unido longitudinalmente al borde dorsal del testículo y se encuentra recubierto por la túnica vaginal y la túnica albugínea (Pasch, 2024). Anatómicamente, se divide en tres regiones: cabeza (caput), fijamente unida al polo craneal del testículo; cuerpo (corpus), que recorre la superficie dorsal; y cola (cauda), conectada con el conducto deferente. En el caballo, su longitud total —si se extendiera— puede alcanzar entre 72 y 80 metros debido al plegamiento del conducto epididimario (Orsolini et al., 2021). La principal función del epidídimo es transportar, madurar y almacenar espermatozoides. El transporte espermático se ve influido por diversos factores: la presión ejercida por la producción continua de espermatozoides en el testículo, la acción de contracciones

peristálticas del epitelio muscular liso del epidídimo y estímulos externos como el movimiento corporal del animal (Peña, 2024). Durante la eyaculación, las contracciones del epidídimo y del conducto deferente, junto con la presión negativa generada por la uretra, facilitan el desplazamiento de los espermatozoides hacia el tracto reproductivo femenino (González-Castro et al., 2024). La cola del epidídimo constituye el principal sitio de almacenamiento, proporcionando un ambiente que mantiene la viabilidad espermática durante periodos prolongados. La maduración espermática ocurre principalmente durante el tránsito desde la cabeza hasta la cola del epidídimo: los espermatozoides adquieren motilidad progresiva, capacidad de fertilización y pierden la gota citoplasmática que estaba presente en la pieza intermedia (Orsolini et al., 2021). Una alta proporción de gotas citoplasmáticas en el semen eyaculado es indicativa de inmadurez y menor fertilidad. Además, el epidídimo participa en la eliminación de espermatozoides viejos o anormales, contribuyendo al mantenimiento de la calidad espermática general (Pasch, 2024).

2.2.1.3. *Cordón espermático*

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se unen y se extiende oblicua y ventralmente a través del canal inguinal, pasa sobre el lado del pene para terminar en el borde de inserción del testículo. El cordón espermático está formado por: Arteria testicular, venas testiculares, plexo testicular, conducto deferente, haces de tejido muscular liso y capa visceral de la túnica vaginal. Tanto el cordón espermático como el escroto ayudan al sostén de los testículos, así mismo tienen la función conjunta de mantener la temperatura testicular aproximando los testículos al cuerpo cuando la temperatura ambiente es muy baja o dejarlos colgar apartados del cuerpo cuando aumenta (Álvarez, 2020).

2.2.1.4. *Uretra*

Es un tubo que se extiende de la vejiga hacia la última porción del pene. La porción pélvica de la uretra está envuelta por el músculo uretral, que se contrae vigorosamente durante la eyaculación. La uretra finaliza en una extensión libre llamada proceso uretral; entro del pene la uretra se localiza rodeada por el cuerpo esponjoso, que es un área cavernosa de tejido eréctil que sirve como canal excretorio de la orina y el semen, la cual sería una continuación de la cola del epidídimo (Álvarez, 2020).

2.2.1.5. *Escroto*

Es una bolsa en la que están situados los testículos y las partes adyacentes del cordón espermático, tiene forma globular, pero es asimétrico comúnmente, ya que un testículo mayormente el izquierdo es mayor y está ubicado un poco más caudalmente. El escroto se encuentra conformado varias capas; una capa externa de piel gruesa con numerosas glándulas sudoríparas y sebáceas, la túnica dartos que divide al escroto en dos bolsas, fascia escrotal y la capa parietal (Álvarez, 2020).

Es necesario que el testículo este a una temperatura de 0.5 a 4º C menor a la del resto del organismo y que este mecanismo de regulación está dado por dos músculos lisos: túnica dardos y cremaster, además de un musculo liso situado alrededor del cordón espermático, ambos termo sensibles (Álvarez, 2020).

2.2.1.6. *Glándulas sexuales accesorias*

Las glándulas sexuales accesorias son un conjunto de glándulas que se localizan entre la parte final del conducto deferente y la base del pene.

- Próstata: Es una glándula de forma lobulada que asienta en el cuello de la vejiga y al principio de la uretra, ventral al recto. Está formada por dos lóbulos laterales y un istmo de conexión; Cada glándula es de 3x1,5x0,5 (Álvarez, 2020).
- Vesículas seminales: Son dos sacos piriformes elongados, que asientan a cada lado de la parte caudal de la superficie dorsal de la vejiga, en el semental equino tiene unos 15-20 cm de largo y su diámetro mayor es de unos 5 cm. En el caballo se les considera a las vesículas seminales como productoras de la última porción del eyaculado en forma de gel; la función de las vesículas seminales se encuentra dependiente de la testosterona, por lo que las secreciones son más abundantes durante la estación reproductiva que durante el otoño o invierno. Las vesículas seminales secretan un fluido gelatinoso (Álvarez, 2020).
- Glándulas bulbouretrales: Estas glándulas son pares, lobuladas, de forma ovoide y situada cerca del arco isquiático. Su medida en el semental es de unos 4cm de longitud y unos 2.5 cm de anchura y posee 6-8 conductos excretores que se abren a la uretra por detrás de los conductos prostáticos. La función de las glándulas accesorias es la

secreción del plasma seminal, el mismo que ayuda al transporte de los espermatozoides a través del tracto hasta la yegua, otra función importante es la maduración final de los espermatozoides ya que son activados al mezclarse en la uretra con las secreciones de las glándulas accesorias. También intervienen favorablemente sobre la vitalidad, duración y movimiento de los espermatozoides (Álvarez, 2020).

2.2.1.7. *Pene*

Es el órgano masculino de la copulación tiene forma cilíndrica, en estado de flacidez, mide cerca de 50 cm de largo y de 3 a 6 cm de diámetro, mientras que el pene erecto puede medir hasta 100 cm o más de largo. El pene del equino no posee flexura sigmoidea; se divide en tres porciones: la raíz que se halla adherida al hueso de la pelvis; el cuerpo que es la porción central del pene; y el glande que es la parte terminal (Álvarez, 2020).

El glande del equino contiene mucho más tejido eréctil del que se encuentra en toros, cerdos o borregos, es redondeado y la parte anterior muestra una superficie cóncava (fosa del glande). Los elementos estructuras del pene son el cuerpo cavernoso y cuerpo esponjoso; las áreas cavernosas se llenan de sangre durante la excitación sexual, lo que causa la tensión del pene (erección) y facilita la expulsión final del semen durante la eyaculación (Álvarez, 2020).

2.2.1.8. *Prepucio*

El prepucio vulgarmente llamado “vaina” es una invaginación de la piel que cubre por completo la porción libre del pene cuando no se encuentra eréctil, formado de dos partes; externa e interna. Las glándulas sebáceas modificadas situadas en el prepucio secretan una secreción llamada “esmegma”, quien cumple la función de facilitar la introducción del órgano de la copula erecto dentro de los genitales de la hembra (Álvarez, 2020).

2.2.2. *Observación de la libido y de la capacidad de monta*

La buena calidad de semen no asegura la capacidad reproductiva, a menos que el padrillo también tenga el deseo y la capacidad de liberar semen dentro del tracto reproductivo de la yegua o una vagina artificial. La conducta sexual se puede examinar por medio de la exposición del padrillo a una yegua en estro en su mayoría, el padrillo con buena libido

muestra un deseo inmediato e intenso por la yegua, mostrando inquietud, patadas, vocalizaciones, actividad precopulatoria intima (por ej., olfateo, lamido y mordisqueos, exhibición de la reacción de Flehmen al momento que la yegua orina); y desarrollo de erección (Vera, 2019).

El inicio, la intensidad y la duración de este periodo se ven afectados por la marca genética y la conducta aprendida (a través de experiencias positivas y negativas por el padrillo), así como por la limitación de variación estacional y las enfermedades. Una causa que disminuye o ausenta la libido en los padrillos en su gran mayoría es el mal manejo, principalmente por su uso excesivo o el abuso repetitivo de intentos para que exprese interés sexual. La duración de esta fase y el número de montas requeridas para la eyaculación tienden a crecer en el invierno, en comparación con el verano (Vera, 2019).

2.2.3. *Endocrinología reproductiva del macho*

Para que los testículos puedan producir espermatozoides de forma continua es necesario que el eje hipotálamo - hipófisis - gónadas, esté en sincronía. El hipotálamo sintetiza y descarga la hormona liberadora que es la GnRH, esta es secretada por el hipotálamo en explosiones pulsátiles, que van a estimular a la adenohipófisis y se produce FSH y LH (Álvarez, 2020).

La FSH actúa directamente sobre los túbulos seminíferos del testículo (células germinales y células de sertoli), estimulando de esta manera la espermatogénesis. Las células de sertoli producen inhibina, que tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH por parte de la hipófisis. La LH va a estimular directamente a las células de Leydig para que se produzcan andrógenos principalmente testosterona (Álvarez, 2020).

La testosterona (que actúa sobre las células de Sertoli) también es necesaria para la espermatogénesis. Tanto esta y otros andrógenos son responsables de la diferenciación y la maduración de los órganos reproductores masculinos, además del comportamiento normal del macho en la reproducción. La testosterona ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH suprimiendo la secreción pulsatil de GnRH por parte del hipotálamo. Las células de Leydig también secretan Oxitocina dentro del líquido intersticial. Lo que proporciona las contracciones rítmicas de los túbulos seminíferos que ayudan a la evacuación de los espermatozoides (Vera, 2019).

2.2.4. *Vagina artificial*

La vagina artificial (V.A.) es uno de los métodos más empleados en la reproducción asistida equina para la colección de semen. Existen principalmente tres modelos comunes: Colorado, Missouri y Japonés, clasificados como vaginas artificiales cerradas, ya que permiten obtener una muestra completa de semen que incluye tanto la fracción espermática como la del plasma seminal, es decir, el eyaculado íntegro (Orsolini et al., 2021). La V.A. está diseñada para replicar las condiciones fisiológicas de la vagina de la yegua, especialmente en términos de presión, temperatura y tacto. El dispositivo se prepara y acondiciona antes del proceso de excitación del caballo, y cuenta con un sistema hermético para la recolección del eyaculado, manteniendo la muestra en condiciones óptimas (Peña, 2024).

Modelos de vagina artificial

- Modelo Missouri: Destacado por su bajo costo, ligereza y facilidad de manejo y limpieza. Está compuesto por una doble camisa de látex sellada que forma la cámara de agua, envuelta en una carcasa de cuero para facilitar la manipulación. Cuenta con una válvula que permite ajustar la presión mediante aire, agua o ambos, reduciendo así su peso. Sin embargo, el mantenimiento térmico es menos eficaz que en otros modelos, aunque los espermatozoides no entran en contacto directo con el área caliente del látex, lo que ayuda a preservar su viabilidad (Vera, 2018., citado por Peña, 2024).

- Modelo Japonés: Consiste en un tubo metálico rígido de aluminio con una camisa de látex que forma la cámara de agua. Es fácil de manejar y limpiar, aunque más pesado que el Missouri. Requiere un ajuste cuidadoso de las bandas de goma para evitar filtraciones y contaminación de la muestra (Vera, 2018., citado por Peña, 2024).

- Modelo Colorado: Está formado por una cubierta de plástico duro y dos camisas de látex que integran la cámara de agua, permitiendo un mejor mantenimiento de la temperatura. Sin embargo, el mayor largo de la vagina artificial en comparación con el pene puede ocasionar que el semen entre en contacto con zonas más calientes, lo que puede afectar negativamente la viabilidad espermática por daño térmico. La correcta selección de la vagina artificial es fundamental para optimizar tanto la recolección como la evaluación seminal (Vera, 2018., citado por Peña, 2024).

2.2.5. *Colección del semen*

La colecta de sementales debe hacerse lo más natural posible con la finalidad de que la muestra no se vea alterada en su calidad principalmente en relación a su concentración y volumen (Vicente, 2006., citado por Abril, 2023).

La gran mayoría de los sementales, fácilmente pueden ser adiestrados para la colección de semen. Existen diferentes modalidades de recogida, se puede utilizar una yegua estrogenizada, un maniquí artificial o caballo en estación sin necesidad de yegua, pero esta última es mucho más dificultosa. La yegua utilizada para la colección debe preparase vendándole la cola, para evitar laceraciones en los órganos externos y colocando un tirapié, impidiendo de esta manera lastimar al semental o al operador al momento del cortejo o colección (Vera, 2018., citado por Peña, 2024).

El semen será colectado por la desviación del pene hacia una vagina artificial. Es necesario reconocer los movimientos pelvianos del macho y favorecer que la eyaculación se realice a la mayor profundidad posible en la vagina artificial, para evitar el shock térmico de los espermatozoides. En ocasiones, ciertos sementales se muestran caprichosos, pues la temperatura y la presión de la vagina artificial no son los apropiados y por lo tanto no eyaculan. La producción de semen de alta calidad depende en su gran mayoría del mantenimiento de los machos en buenas condiciones y también la alimentación que influye sobre la rapidez del desarrollo sexual en los animales domésticos (Vera, 2018., citado por Peña, 2024).

2.2.6. *Semen equino*

El semen del equino, está formado por tres ondas eyaculatorias los que en tiempos distintos evacuan sobre el colector. El eyaculado equino está compuesto por tres ondas eyaculatorias que ocurren en tiempos sucesivos durante la eyaculación, cada una con una función y composición específicas (Morales et al., 2011., citado por Álvarez, 2020):

Primera onda: Procede de la próstata y es rica en electrolitos y sustancias que estimulan la actividad espermática, favoreciendo la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

Segunda onda: Se origina en las ampollas de Henle y contiene la mayor concentración de espermatozoides viables, representando la fracción espermática del eyaculado.

Tercera onda: Proviene de las vesículas seminales y aporta la mayor parte del volumen total del eyaculado. Desde un punto de vista biológico, esta fracción actúa como un medio de taponización, protegiendo a los espermatozoides y facilitando su transporte y supervivencia dentro del tracto reproductor femenino.

La producción diaria de semen y su rendimiento están estrechamente relacionados con el tamaño testicular, la consistencia del tejido testicular y la frecuencia de eyaculados. Esto se debe a que la cantidad de espermatozoides liberados depende del número de células espermatogénicas activas por gramo de tejido testicular; por lo tanto, un mayor volumen testicular se traduce en un mayor potencial para la producción seminal (Orsolini et al., 2021).

Además, el semen equino es una sustancia altamente sensible y frágil, por lo que su manejo requiere precauciones especiales. El recipiente colector debe mantenerse protegido de la luz directa y de cambios bruscos de temperatura para preservar la viabilidad espermática y evitar daños celulares que comprometan la fertilidad (Morales et al., 2011., citado por Álvarez, 2020).

2.2.6.1. *Características seminales macroscópicas*

En lo que se refiere al volumen libre de gel en el caballo es de 60 - 100 ml aunque pueden obtenerse volúmenes tan dispares en los sementales de entre 10 ml a más de 250 ml; El volumen mínimo aceptado en sementales de 2 años es de 30 ml y los mayores de 5 años deben eyacular no menos de 50 ml. El color del semen cambia de un animal a otro ya que depende del régimen alimentario al que está sometido (Álvarez, 2020).

La apariencia del eyaculado al igual que el color del mismo, es un indicativo de la concentración espermática; el semen fresco de un potro puede tener apariencia acuosa o lechosa, siendo la de aspecto lechosa de mayor concentración que la acuosa. El Olor de un eyaculado se considera Sui Generis, un olor típico según la especie. El rango normal del pH varía entre 6,9 y 7,6 siendo las muestras de menor pH las de mayor concentración espermática, debido a los ácidos secretados a nivel del epidídimo (Álvarez, 2020).

2.2.6.2. *Características seminales microscópica*

La evaluación de la motilidad espermática debe realizarse lo más pronto posible tras la recolección del semen para obtener resultados precisos, dado que el tiempo y las condiciones pueden afectar la calidad espermática (Carvalho et al., 2022). El porcentaje normal de motilidad progresiva en caballos fértiles oscila en torno al 70%, con rangos desde 60% hasta 95%. La evaluación consiste en observar el porcentaje de espermatozoides con movimiento oscilatorio que avanzan hacia adelante (Peña et al., 2024).

La concentración espermática es un parámetro clave para determinar el potencial reproductivo del semental. El rango típico se encuentra entre 150 y 300 millones de espermatozoides por mililitro, con un total de 1 a 20 billones por eyaculado. La producción espermática está directamente relacionada con el tamaño testicular y la actividad espermatogénica del parénquima testicular (Orsolini et al., 2021).

La morfología espermática es otro indicador importante de fertilidad. El análisis morfológico mediante tinción eosina-nigrina permite identificar anomalías estructurales en cabeza, pieza intermedia y cola. Un porcentaje mínimo del 50% de espermatozoides morfológicamente normales se considera aceptable para la fertilidad (Carvalho et al., 2022).

2.2.7. *Manejo del semen post extracción y almacenamiento*

Durante la colección de semen y su posterior transporte al laboratorio, la muestra debe ser mantenida a una temperatura de 37 ºC hasta su evaluación. Es por esto que todo el instrumental que tenga contacto con el semen, deberá estar calentado a la temperatura mencionada anteriormente. Es conveniente usar microscopios con platina térmica, así como también calentar los porta y cubreobjetos y pipetas para evitar el shock de frio. Aire, luz ultravioleta, agua, sangre y/u orina son considerados espermicidas, por consiguiente, no deberían tener contacto con nuestra muestra (Álvarez, 2020).

El plasma seminal juega un papel importante. Una concentración muy alta tiene efecto deletéreo en semen almacenado refrigerado; se ha reportado que la centrifugación y la remoción parcial del plasma seminal previo al almacenamiento a 5 °C por 24-48 h, resultó en un aumento de la motilidad en semen de padrillos cuyas características mótiles eran ampliamente menores mediante el procesamiento convencional (Álvarez, 2020).

Durante la recolección y transporte, la muestra de semen debe mantenerse a una temperatura constante cercana a 37 °C para preservar la viabilidad y funcionalidad espermática. Todo el material que entre en contacto con el semen debe estar precalentado para evitar el choque térmico, incluyendo microscopios con platinas térmicas y portaobjetos (López et al., 2021). Además, se deben evitar contaminantes espermicidas como luz ultravioleta, aire, orina o sangre (González et al., 2022).

El plasma seminal juega un papel importante en la conservación del semen. Su concentración debe ser controlada, ya que altos niveles pueden resultar perjudiciales durante el almacenamiento refrigerado. La remoción parcial del plasma seminal mediante centrifugación mejora la motilidad en semen almacenado a 5 °C por 24-48 horas (Martínez y Pérez, 2020). Sin embargo, la eliminación total del plasma puede reducir la motilidad, indicando que una concentración residual es necesaria para mantener la funcionalidad espermática. La dilución del semen debe realizarse idealmente dentro de los primeros 3 minutos post colección, con diluyentes precalentados a 37 °C y factores de dilución entre 1:2 y 1:4, aumentando la supervivencia espermática (Rodríguez et al., 2023).

Los diluyentes de semen equino, comúnmente basados en leche descremada o yema de huevo, contienen lipoproteínas que estabilizan la membrana espermática y reducen el daño por choque térmico. Además, incorporan antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, siendo la amikacina y penicilina los más utilizados, mientras que el uso de gentamicina se ha reducido por su toxicidad en altas concentraciones, aunque dosis controladas pueden ser efectivas (Santos et al., 2022).

El semen fresco debe conservarse a 37 °C y usarse preferentemente dentro de las 12 horas posteriores a la extracción. La conservación mediante refrigeración ha ganado aceptación debido a la disponibilidad de métodos confiables como el uso de dispositivos de enfriamiento controlado (Equitainer®) que minimizan el choque térmico y permiten mantener la motilidad y viabilidad espermática durante 24 a 48 horas (García y López, 2021).

La inseminación con semen refrigerado ofrece ventajas como la posibilidad de evaluar la calidad seminal y el número de espermatozoides, eliminar barreras geográficas, reducir la transmisión de enfermedades y permitir la inseminación de yeguas con ciertas patologías (Rodríguez et al., 2023).

En comparación, el semen congelado requiere mayor especialización y presenta menor fertilidad debido a daños ocasionados en los procesos de congelación y descongelación. No obstante, su almacenamiento a largo plazo y transporte internacional son ventajas significativas que superan estas limitaciones (Martínez y Pérez, 2020). Estudios recientes reportan tasas de preñez que varían entre 50 y 70% con semen congelado y superiores al 80% con semen refrigerado bajo condiciones óptimas (Santos et al., 2022; García y López, 2021). Para minimizar daños durante la refrigeración, el semen debe enfriarse gradualmente, con una tasa rápida controlada hasta 20 °C y luego un enfriamiento más lento hasta 5 °C, evitando la zona crítica entre 19 °C y 8 °C que puede ocasionar choque térmico irreversible (Rodríguez et al., 2023).

2.2.8. *Dilución y centrifugación*

En los protocolos actuales de congelación del semen equino, es indispensable retirar la mayor parte del plasma seminal mediante centrifugación simple, seguida de la resuspensión del pellet espermático en diluyentes específicos para congelación. Esta práctica permite concentrar los espermatozoides y minimizar el efecto deletéreo del plasma seminal, que en concentraciones superiores al 20% puede reducir la motilidad, integridad de membranas y viabilidad espermática durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Alvarenga et al., 2016; Fernández et al., 2021).

Para la dilución, se emplean diluyentes a base de leche descremada o caseína, los cuales proporcionan nutrientes y factores estabilizantes que protegen la membrana espermática frente a daños térmicos y osmóticos. La relación de dilución se ajusta en función de la concentración seminal: en eyaculados muy concentrados se utiliza una proporción de 2:1, mientras que la mínima relación recomendada es 1:1. Es crítico que el diluyente se añada a una temperatura de 37 °C para evitar el choque térmico, lo cual puede causar daños irreversibles en los espermatozoides (Martínez et al., 2022). Además, los diluyentes modernos incluyen antioxidantes y agentes estabilizantes que mejoran la protección durante la congelación y descongelación, contribuyendo a mantener la motilidad y capacidad fertilizante tras el proceso (López et al., 2023). Las técnicas de centrifugación han sido optimizadas para reducir el estrés mecánico, utilizando velocidades y tiempos controlados para maximizar la recuperación y viabilidad espermática (Santos et al., 2020).

El control térmico durante la adición del diluyente y durante el proceso de enfriamiento es clave para la conservación de la funcionalidad espermática. Se recomienda un enfriamiento progresivo y controlado desde 37 °C hasta 5 °C, evitando la zona crítica de temperatura entre 19 °C y 8 °C para prevenir el shock frío (Rodríguez et al., 2023).

2.2.9. Tipos de diluyentes para semen equino

Los diluyentes para semen equino se diseñan para mantener la viabilidad espermática durante la refrigeración y congelación, proporcionando nutrientes, estabilización osmótica y protección contra el estrés oxidativo. Actualmente, los diluyentes más comunes son a base de leche descremada y yema de huevo, aunque han surgido formulaciones modernas que incorporan antioxidantes, azúcares específicos y proteínas estabilizadoras (López et al., 2023).

- **Diluyentes a base de leche descremada:** Proveen lipoproteínas que protegen la membrana espermática durante los cambios térmicos. Son económicos y fáciles de preparar, pero pueden contener variabilidad en su composición según la fuente (Fernández et al., 2021).
- **Diluyentes con yema de huevo:** Ofrecen protección adicional por fosfolípidos y antioxidantes naturales, aunque pueden presentar problemas bacteriológicos si no se manejan correctamente (Martínez et al., 2022).
- **Formulaciones modernas:** Incorporan antioxidantes como la vitamina E, glutatión, y compuestos como el trehalosa para proteger a los espermatozoides de daños por radicales libres durante la congelación (López et al., 2023).

La elección del diluyente debe adaptarse a las características individuales del semen del padrillo y a las condiciones específicas del protocolo de congelación para maximizar la supervivencia espermática (Santos et al., 2020).

2.2.10. Manejo de la centrifugación en semen equino

La centrifugación es el método estándar para remover el plasma seminal antes de la congelación. Sin embargo, debe ser cuidadosamente controlada para evitar daños mecánicos a los espermatozoides:

- **Velocidad y tiempo:** Se recomienda centrifugar a bajas velocidades (300-600 g) durante periodos cortos (5-10 minutos) para reducir el estrés mecánico (Santos et al., 2020).
- **Uso de medios específicos:** Algunas técnicas emplean gradientes de densidad para mejorar la recuperación espermática y eliminar células muertas o contaminantes (Fernández et al., 2021).
- **Efectos sobre la calidad:** Una centrifugación excesiva puede ocasionar pérdida de motilidad, integridad de membrana y viabilidad, afectando la fertilidad del semen congelado (Martínez et al., 2022).

Por ello, optimizar las condiciones de centrifugación es clave para preservar la calidad espermática durante el procesamiento (Santos et al., 2020).

2.2.11. La crio preservación

La criopreservación del semen equino es una biotecnología fundamental para la conservación y diseminación del material genético de sementales con alto valor genético, especialmente aquellos valorados por sus características funcionales y rendimiento, más allá de su capacidad reproductiva directa (Rodríguez, 2023). Esta tecnología permite no solo la preservación a largo plazo, sino también la ampliación del alcance geográfico para programas de inseminación artificial, facilitando el mejoramiento genético a nivel nacional e internacional (García et al., 2021).

método tradicional de congelación mediante inmersión directa en vapores de nitrógeno líquido es ampliamente utilizado debido a su bajo costo y facilidad de acceso. Sin embargo, presenta importantes limitaciones, ya que las rápidas velocidades de enfriamiento y la desaceleración abrupta pueden causar la formación de cristales de hielo intracelular, lo que induce daños en la membrana plasmática, la integridad del ADN y la funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides (Rodríguez, 2023).

Estos daños criogénicos se traducen en una disminución significativa de la motilidad y viabilidad espermática tras la descongelación, afectando la fertilidad (López et al., 2022). Como respuesta a estas limitaciones, los biocongeladores han emergido como una alternativa tecnológica avanzada que permite un control más preciso y homogéneo.

Estos dispositivos optimizan la disipación del calor durante la congelación, minimizando el estrés térmico y reduciendo la formación de cristales de hielo, lo cual preserva mejor la integridad estructural y funcional de los espermatozoides (Fernández et al., 2021). Además, su capacidad para procesar múltiples pajillas simultáneamente mejora la eficiencia del manejo y almacenamiento del semen (González et al., 2022).

Recientes estudios han demostrado que la implementación de protocolos con biocongeladores incrementa significativamente la motilidad progresiva y la integridad de la membrana post-descongelación, aspectos claves para mantener la fertilidad del semen criopreservado (Martínez et al., 2020; López et al., 2022). Adicionalmente, la combinación de biocongeladores con la inclusión de crioprotectores y antioxidantes específicos en los diluyentes contribuye a mitigar el daño oxidativo y a mejorar la supervivencia espermática durante el almacenamiento prolongado (Fernández et al., 2021).

En resumen, el avance tecnológico en la criopreservación equina mediante biocongeladores representa un progreso significativo que permite optimizar la calidad seminal, ampliar la vida útil del semen almacenado y potenciar los resultados reproductivos en programas de inseminación artificial (Rodríguez, 2023; García et al., 2021).

2.2.12. Sperm Filter

El filtro de membrana sintético hidrófilo desechable es una tecnología emergente empleada para la separación del plasma seminal en muestras de semen equino. Este filtro utiliza una superficie hidrofílica que atrae selectivamente las moléculas más pequeñas presentes en el plasma seminal, permitiendo que los espermatozoides queden concentrados sobre la membrana, facilitando así su recuperación (Martínez et al., 2021).

Entre los beneficios del uso del SpermFilter se destacan una mayor tasa de recuperación espermática en comparación con la centrifugación tradicional, menor costo operativo y la facilidad de uso con una capacitación mínima, lo que lo hace especialmente atractivo para criadores y laboratorios con recursos limitados (García et al., 2022). Además, se considera que esta técnica genera menos daño mecánico a los espermatozoides, ayudando a preservar la viabilidad y motilidad tras el procesamiento (Santos et al., 2020).

Sin embargo, investigaciones recientes han reportado algunas limitaciones, como alteraciones morfológicas en los espermatozoides procesados con SpermFilter, especialmente un aumento en la incidencia de cabezas desprendidas, lo que podría afectar la calidad fertilizante del semen (Pérez et al., 2023). Estas alteraciones podrían estar asociadas a factores físicos relacionados con el paso del semen a través de la membrana o a condiciones específicas de manejo durante el filtrado.

Actualmente, se están explorando mejoras en el diseño de filtros y en protocolos de uso para minimizar estas alteraciones y optimizar la recuperación y calidad del semen procesado (Martínez et al., 2021). La integración de esta tecnología con métodos complementarios, como la evaluación microscópica detallada y pruebas funcionales de viabilidad espermática, es fundamental para validar su eficacia en la reproducción asistida equina (García et al., 2022).

2.2.13. Integridad de la cromatina espermática

La integridad de la cromatina espermática es un parámetro determinante en la evaluación avanzada de la calidad seminal, ya que refleja el grado de compactación y estabilidad del ADN en el núcleo espermático. Este proceso es fundamental para asegurar una fertilización exitosa y un desarrollo embrionario normal (Kumaresan et al., 2020).

Según Kumaresan et al. (2020), los espermatozoides portan un ADN altamente condensado, empaquetado con protaminas, que normalmente protege la información genética de daños físicos y oxidativos. Sin embargo, factores como el estrés oxidativo, fallas en la espermatogénesis, o incluso técnicas de manipulación post-colecta como la centrifugación, pueden inducir fragmentaciones o desestructuraciones en la cromatina. Esta alteración no siempre es visible mediante análisis tradicionales (motilidad, morfología), lo que justifica la incorporación de métodos complementarios como la tinción con naranja de acridina, el ensayo cometa o la citometría de flujo. En este contexto, se ha demostrado que técnicas menos agresivas, como la filtración por gravedad, pueden preservar mejor la integridad del ADN espermático, lo cual es particularmente relevante en procedimientos de refrigeración seminal, donde los espermatozoides no atraviesan las barreras de selección natural del tracto reproductivo (Kumaresan et al., 2020).

2.2.14. Métodos para la detección de daño en el ADN de espermatozoides

Tabla 1

Métodos para la detección de daño en el ADN de espermatozoides

Ensayo	Método	Principio	Ventajas	Limitaciones
SCSA (estructura cromatina esperma)	Citometría de flujo	Mide desnaturalización del ADN (ácido/calor) vía cambio fluorescente verde/rojo	Alta precisión para estimar % de ADN dañado	Requiere citómetro de flujo y técnicos altamente cualificados
Prueba de dispersión de cromatina	Microscopía de fluorescencia	Detecta dispersión de halo en ADN fragmentado	Simple, rápida y reproducible; sin necesidad de equipos costosos	Poco conocida su relevancia clínica; técnica reciente
Tinción con toluidina	Microscopía óptica	Tinción metacromática/ortocromática sensible al empaquetamiento del ADN	Económica y sencilla; permite láminas permanentes para observación	Limitada repetibilidad por variaciones del tinte
CMA3	Microscopía/Flujo	Compite con protaminas por sitios de unión en el ADN	Alta correlación con otros ensayos; confiable	Subjetiva si es observación manual; costosa si se usa citometría
Naranja de acridina (AO)	Microscopía/Flujo	Mide desnaturalización inducida por ácido con cambio fluorescente	Alta reproducibilidad interensayo (>5%)	Subjetiva por observador; puede requerir equipamiento costoso
Anilina	Microscopía óptica	Discrimina histonas (lisina) vs protaminas (arginina/cisteína)	Económica y permite preparaciones permanentes	Repetibilidad limitada por variación del tinte
TUNEL	Fluorescencia/Flujo	Marca dUTP en roturas de cadena simple y doble del ADN	Alta precisión; variabilidad intra e interobservador <8% y <7%	Equipamiento costoso si se usa citometría de flujo
Ensayo Cometa	Microscopía fluorescente	Cuantifica daño de ADN según longitud de cola en método alcalino/neutro	Bajo costo, correlación con SCSA y TUNEL, bien estandarizado	Requiere analista experto
INST (In situ nick translation)	Microscopía fluorescente	Marca directa extremos de roturas del ADN	Alta especificidad molecular; detecta daño endógeno	Costoso si se emplea citometría
8-OHdG	Cromatografía líquida	Cuantifica aductos de guanosina oxidada (biomarcador de daño oxidativo)	Alta sensibilidad y especificidad	Riesgo de oxidación artefactual durante el análisis
ORP (oxidation-reduction potential)	Sistema MiOXSYS	Relación entre ROS y antioxidantes en la muestra seminal	Alta reproducibilidad; mide directamente el estrés oxidativo	Técnica nueva; aún se desconoce relevancia clínica

Nota. Adaptado de Arumugam Kumaresan, et al. (2020)

2.2.15. *Evaluación de la cromatina espermática mediante SCSA*

El ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA, por sus siglas en inglés) es una técnica robusta y precisa para evaluar la integridad del ADN espermático, permitiendo cuantificar daños que no son detectables mediante parámetros convencionales como motilidad o morfología. Este método se basa en la desnaturalización controlada del ADN seguida de tinción con naranja de acridina y análisis mediante citometría de flujo, donde la fluorescencia verde indica ADN intacto de doble cadena y la fluorescencia roja evidencia fragmentación o desnaturalización del ADN (Smith et al., 2021).

Estudios recientes han validado el SCSA en diversas especies, incluyendo equinos, demostrando su utilidad clínica para identificar daños submicroscópicos en la cromatina que impactan negativamente en la fertilidad, incluso cuando otros parámetros seminales parecen normales (González et al., 2022). La capacidad del SCSA para establecer umbrales predictivos de éxito reproductivo lo convierte en una herramienta indispensable para evaluar el impacto de diferentes técnicas de procesamiento seminal, como la centrifugación versus filtración por membrana (Martínez et al., 2023).

2.2.16. Uso de la fluorescencia en evaluación espermática

La aplicación de técnicas basadas en fluorescencia en espermatozoides ha revolucionado la evaluación de la calidad seminal, permitiendo el análisis detallado de diferentes aspectos celulares y moleculares que no son visibles con métodos convencionales. Mediante el uso de fluorocromos específicos, es posible detectar parámetros como la integridad de la membrana plasmática, la viabilidad, el estado mitocondrial, la integridad del ADN y la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros (Hernández et al., 2020).

Uno de los usos más comunes es la tinción con naranja de acridina para diferenciar ADN intacto y fragmentado, como en el ensayo SCSA (Evenson et al., 2002). Asimismo, se emplean colorantes como el ioduro de propidio (IP) y el verde de SYBR-14 para discriminar espermatozoides vivos y muertos mediante citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (López et al., 2021). Además, técnicas basadas en fluorescencia permiten detectar cambios en la membrana celular mediante la utilización de fluorocromos como la anexina V, que marca la fosfatidilserina expuesta en la membrana de espermatozoides en apoptosis (Martínez et al., 2022).

La evaluación de la fluorescencia también facilita la detección de daños oxidativos en el esperma, factor clave en la infertilidad masculina y en la reducción de la capacidad fecundante del semen conservado (García et al., 2023). Por ejemplo, el uso de sondas fluorescentes específicas para especies reactivas de oxígeno (ROS) ayuda a cuantificar el estrés oxidativo, lo cual se correlaciona con deterioro funcional y estructural espermático.

Estas técnicas de fluorescencia constituyen herramientas fundamentales en la investigación y diagnóstico en reproducción asistida, permitiendo mejorar los protocolos de conservación, selección y manejo del semen equino, contribuyendo a incrementar las tasas de fertilidad en programas de inseminación artificial (Hernández et al., 2020; Martínez et al., 2022).

2.2.17. Estrés oxidativo en espermatozoides equinos.

El estrés oxidativo (EO) es una de las principales causas de deterioro en la calidad seminal y la fertilidad en equinos. Se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del semen para neutralizarlas. Las ROS en bajas concentraciones cumplen funciones fisiológicas esenciales como la regulación de la motilidad y la capacitation espermática, pero su acumulación excesiva induce daño a las membranas lipídicas, proteínas y ADN, afectando la viabilidad y funcionalidad espermática (García et al., 2023).

Los espermatozoides equinos son especialmente susceptibles al EO debido a su membrana plasmática rica en ácidos grasos poliinsaturados, que son altamente vulnerables a la peroxidación lipídica. Además, su bajo contenido citoplasmático limita la capacidad antioxidante endógena (Torres et al., 2021). Este daño oxidativo puede reducir la motilidad progresiva, alterar la integridad de la membrana plasmática, incrementar la fragmentación del ADN y disminuir la fertilidad (Rodríguez et al., 2022).

El proceso de manipulación del semen, como la recolección, dilución, refrigeración y congelación, puede aumentar la generación de ROS, exacerbando el estrés oxidativo. Por ello, es fundamental implementar protocolos que minimicen el EO, como el uso de diluyentes con antioxidantes específicos, control estricto de temperaturas y tiempos de procesamiento, y la incorporación de técnicas diagnósticas basadas en fluorescencia para la detección temprana del daño oxidativo (García et al., 2023; Martínez et al., 2022).

El control del estrés oxidativo es clave para optimizar la viabilidad y funcionalidad espermática, especialmente en programas de reproducción asistida equina, contribuyendo a mejorar los índices de fertilidad y preservación genética (Torres et al., 2021).

2.2.18. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno y que se generan de manera natural en las células durante procesos metabólicos normales, como la respiración celular. Entre las principales ROS se encuentran el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (•OH) y el óxido nítrico (NO) (Smith et al., 2021).

Aunque en concentraciones moderadas las ROS cumplen funciones fisiológicas esenciales —como la señalización celular, defensa contra patógenos y regulación de la motilidad espermática—, su acumulación excesiva puede ocasionar daño celular. Este daño incluye la peroxidación de lípidos en las membranas celulares, la oxidación de proteínas y la fragmentación del ADN, conduciendo a la pérdida de funcionalidad y viabilidad celular (García et al., 2023).

En los espermatozoides, las ROS juegan un papel dual. Una cantidad controlada es necesaria para procesos como la capacitación y la reacción acrosómica, pero niveles elevados resultan en estrés oxidativo, que compromete la fertilidad (Torres et al., 2021). Por ello, el balance entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes endógenos o suplementarios es crucial para mantener la integridad y funcionalidad espermática.

2.2.19. ¿Cómo evitar el estrés oxidativo en espermatozoides equinos?

El manejo adecuado del estrés oxidativo (EO) es fundamental para preservar la calidad y fertilidad del semen equino, especialmente durante los procesos de recolección, dilución, refrigeración y congelación. A continuación, se describen algunas estrategias eficaces para minimizar el EO:

Uso de antioxidantes en diluyentes y medios de conservación: La suplementación con antioxidantes como la vitamina E, vitamina C, glutatión, superóxido dismutasa, catalasa y coenzima Q10 ha demostrado reducir significativamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteger la integridad espermática (García et al., 2023).

Control estricto de la temperatura: Mantener el semen a temperaturas óptimas (generalmente 37 °C durante la recolección y enfriamiento controlado durante el almacenamiento) evita el choque térmico que aumenta la producción de ROS. La reducción gradual de la temperatura durante la refrigeración (enfriamiento controlado) disminuye el daño a la membrana espermática y limita la peroxidación lipídica (Torres et al., 2021).

Minimizar el tiempo entre recolección y procesamiento: El semen debe ser procesado y diluido lo más rápido posible para evitar la acumulación de ROS y la exposición prolongada a factores externos que promueven el estrés oxidativo (Martínez et al., 2022).

Evitar contaminación y manipulación excesiva: El contacto con aire, luz ultravioleta, sangre, orina o agentes contaminantes puede incrementar la producción de ROS. Asimismo, técnicas invasivas o repetitivas durante la manipulación pueden dañar el semen y aumentar el EO (Rodríguez et al., 2022).

Optimización de técnicas de procesamiento: Procedimientos como la centrifugación deben realizarse con parámetros controlados para evitar daño mecánico que facilite la generación de ROS. Alternativas como el uso de filtros de membrana pueden disminuir este riesgo (García et al., 2023).

Uso de suplementos dietarios y manejo del reproductor: La nutrición adecuada del semental, incluyendo una dieta rica en antioxidantes naturales (vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales), contribuye a fortalecer sus mecanismos antioxidantes endógenos y reducir la generación excesiva de ROS (Torres et al., 2021).

En conjunto, estas prácticas permiten minimizar el estrés oxidativo en el semen equino, mejorando la supervivencia, funcionalidad y capacidad fecundante de los espermatozoides, lo cual es clave para el éxito en programas de reproducción asistida (García et al., 2023; Martínez et al., 2022).

2.2.20. La naranja de acridina en la evaluación espermática

La naranja de acridina (NA) es un colorante fluorescente ampliamente utilizado para evaluar la integridad del ADN espermático, fundamental para determinar la calidad genética y fertilidad potencial de los espermatozoides (Fernández et al., 2021).

El Mecanismo de acción de la NA se intercala en las bases nitrogenadas del ADN y su fluorescencia varía según el estado estructural del material genético: En ADN de doble cadena intacto, la naranja de acridina se une de forma que emite fluorescencia verde cuando es excitada con luz ultravioleta o azul. Esto indica una cromatina bien compactada y con escasos daños; En ADN desnaturalizado o fragmentado (cadenas simples), la NA emite fluorescencia roja o anaranjada, reflejando daño o alteración en la estructura del ADN (González et al., 2022).

Este contraste permite distinguir espermatozoides con ADN íntegro de aquellos con daño genético, aspecto crítico para la fertilización exitosa. Las aplicaciones prácticas del método con naranja de acridina se emplea en: Citometría de flujo, para analizar rápidamente miles de espermatozoides y cuantificar con precisión la proporción de células con daño en la cromatina; Microscopía de fluorescencia: para observación directa y análisis cualitativo del semen, permitiendo además correlacionar daños cromatínicos con otras características seminales (López et al., 2023). Esta técnica es especialmente útil en la evaluación post-procesamiento seminal, como en muestras refrigeradas o criopreservadas, donde el daño al ADN puede aumentar por estrés térmico y oxidativo (Fernández et al., 2021).

La naranja de acridina ofrece una evaluación rápida y sensible de la integridad del ADN. Es menos invasiva y consume menos tiempo que métodos tradicionales como la electroforesis o el test TUNEL. Sin embargo, requiere equipamiento especializado (microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo) y personal entrenado para interpretar los resultados (González et al., 2022).

2.2.21. La cromatina en espermatozoides equinos y su relación con la fertilidad

La cromatina en los espermatozoides equinos es el material genético altamente compactado que contiene el ADN, fundamental para la transmisión de la información genética al embrión. La estructura y calidad de la cromatina tienen un papel crucial en la fertilidad y el éxito reproductivo. Entre sus funciones y relaciones clave de la cromatina espermática:

Protección del ADN: La cromatina espermática está organizada de manera muy compacta, principalmente por la sustitución de histonas por protaminas, proteínas que permiten empaquetar el ADN de forma densa y estable.

Esta compactación protege el material genético de daños físicos y químicos, especialmente durante el tránsito por el tracto reproductivo y los procesos de congelación y descongelación (Vidal et al., 2022).

Integridad genética y fertilidad: La calidad de la cromatina refleja la integridad del ADN. Daños o fragmentaciones en el ADN (alteraciones en la cromatina) se asocian con menor fertilidad, disminución de la tasa de fertilización, fallos en la implantación y abortos tempranos. En equinos, una alta proporción de espermatozoides con cromatina dañada puede afectar negativamente los resultados en técnicas de reproducción asistida (Martínez et al., 2021).

Capacidad de maduración espermática: La maduración del espermatozoide incluye modificaciones en la cromatina para asegurar su estabilidad. Alteraciones en este proceso pueden indicar espermatozoides inmaduros o defectuosos, los cuales tienen menor capacidad fecundante (Gómez et al., 2023).

Indicador de estrés oxidativo y daños durante el procesamiento: La cromatina es sensible a daños inducidos por estrés oxidativo, frío, congelación y otros factores ambientales. Evaluar la integridad de la cromatina permite identificar el impacto de estos procesos en la calidad seminal (Vidal et al., 2022).

La cromatina espermática es un indicador clave de la fertilidad porque refleja la integridad genética del espermatozoide. Existen varias técnicas modernas para su evaluación:

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): Utiliza naranja de acridina para diferenciar ADN intacto (verde) de ADN fragmentado (rojo). Permite cuantificar el porcentaje de espermatozoides con daño en la cromatina y establecer umbrales predictivos de fertilidad. Es útil para detectar subfertilidad incluso cuando los parámetros tradicionales, como motilidad y morfología, son normales (Fernández et al., 2021).

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling): Identifica fragmentaciones en el ADN mediante la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos libres de la cadena de ADN. Proporciona información precisa sobre la apoptosis espermática o daño genético inducido por estrés oxidativo o congelación (González et al., 2022).

Comet Assay (ensayo cometa): Detecta daño en el ADN a nivel individual mediante electroforesis. Los espermatozoides con daño muestran una "cola" de ADN migrado, cuya longitud y intensidad reflejan la magnitud del daño. Análisis de protaminas y tinción de cromatina: Evalúa la maduración cromatínica mediante tinciones como Anilina o Toluidina azul. Permite detectar espermatozoides inmaduros o con empaquetamiento cromatínico incompleto, lo que correlaciona con menor fertilidad (López et al., 2023).

La evaluación de la cromatina tiene relación con otros parámetros seminales como: Motilidad, Daños en la cromatina suelen asociarse con disminución en la motilidad progresiva. El espermatozoide con ADN fragmentado puede tener metabolismo alterado y menor capacidad de movimiento (Martínez et al., 2021). Morfología: Esperma con anomalías en la cabeza frecuentemente presenta cromatina defectuosa. Por ejemplo, cabezas desprendidas o malformadas pueden indicar daño nuclear (Gómez et al., 2023).

Viabilidad, Una alta proporción de espermatozoides con cromatina dañada se correlaciona con menor viabilidad general, incluso cuando el conteo espermático es normal; Capacidad de fecundación, La integridad de la cromatina es crucial para la fertilización y el desarrollo embrionario. Fragmentaciones en el ADN pueden impedir la implantación o causar pérdidas embrionarias tempranas (Vidal et al., 2022).

2.2.22. Test de Resistencia Hipoosmótica (TRH) en semen equino

El Test de Resistencia Hipoosmótica (TRH) es una técnica utilizada para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. A diferencia de parámetros clásicos como motilidad o morfología, el TRH permite detectar daños submicroscópicos que afectan la capacidad de los espermatozoides para fecundar. El Principio del test se basa en la capacidad de la membrana espermática de mantener la homeostasis frente a cambios osmóticos. Cuando los espermatozoides se exponen a un medio hipoosmótico (menos concentrado en solutos que el citoplasma), el agua entra por ósmosis. En espermatozoides funcionalmente intactos, esto provoca una inflación de la cola o flagelo, observable al microscopio. Si la membrana está dañada, no ocurre hinchamiento; la cola permanece rígida o colapsada. La membrana plasmática intacta es esencial para la motilidad, la fusión con el óvulo y la viabilidad general del espermatozoide (Vidal et al., 2022).

En general la Preparación de la solución hipoosmótica: típicamente se usa una solución con 50 mOsm/L a base de fructosa y sodio citrato. Se mezcla del semen con la solución hipoosmótica en proporción 1:1 o 1:2. Incubación a 37 °C durante 30–60 minutos. Observación bajo microscopio de luz a 400x: se cuentan 100–200 espermatozoides y se determina el porcentaje de células con cola hinchada. Para la Interpretación: ≥ 70% de espermatozoides con cola hinchada → membrana funcional intacta, buen indicador de fertilidad; < 50% → membrana dañada, riesgo de baja viabilidad y fertilidad reducida (Vidal et al., 2022).

Entre las Aplicaciones en reproducción equina podemos mencionar que no permite determinar la viabilidad funcional de semen fresco, refrigerado o congelado. Evaluar el impacto de técnicas de procesamiento, como centrifugación, filtración, dilución o criopreservación, sobre la membrana espermática. Complementar parámetros tradicionales (motilidad, concentración y morfología) para predecir capacidad fecundante en inseminación artificial (Vidal et al., 2022).

2.3. Hipótesis o ideas a defender

Hi: El porcentaje de viabilidad de semen crio preservado es mejor al utilizar Spermfilter frente a la centrifugación como métodos de eliminación de plasma seminal.

Ho: El porcentaje de viabilidad de semen crio preservado no presenta diferencias al utilizar Spermfilter frente a la centrifugación como métodos de eliminación de plasma seminal.

Ha: El porcentaje de viabilidad de semen crio preservado es mejor al utilizar la centrifugación frente a la Spermfilter como métodos de eliminación de plasma seminal.

2.4. Variables

Las variables independientes de la investigación son: el Spermfilter y la centrifugación como métodos de eliminación de plasma seminal, y la dependiente la viabilidad de los espermatozoides en el semen post congelación.

Variables Independientes: Centrifugación y SpermFilter

Variables Dependientes: la viabilidad de los espermatozoides pre y post congelación.

2.5. Operacionalización de variables

Tabla 2

Variables Independientes a ser medidas.

Variable independiente	Definición	Indicadores	Escala	Técnica e instrumentos
Sperm filter	Filtro de membrana sintético hidrófilo utilizado para filtrar espermatozoides del plasma seminal.	Volumen recuperado del eyaculado.	ml	Técnica de Filtración del eyaculado. Se utilizarán: • Sperm filter • Vasos de precipitación • Pipetas • Diluyentes de conservación.
Centrifugación	El semen protegido con diluyente es sometido a centrifugación a 1000 rpm.	Volumen recuperado del eyaculado	ml	Técnica de centrifugación. Mediante la utilización de: • Centrifuga • Diluyente Ram plus • Tubos falcon. • Pipetas • Vaso de precipitación

Nota: La tabla presenta la descripción de las variables independientes.

Tabla 3

Variables dependientes a ser medidas

Variable	Definición	Indicadores	Escala	Técnica e instrumentos
Recuperación espermática	Concentración espermática en semen fresco y post eliminación del plasma	Concentración de espermatozoides presentes en el semen recuperado	$x10^9$sp/ml	Microscopio Contador digital de células LUNA FL
Motilidad individual post congelación	Movimientos progresivos de espermatozoides vista mediante microscopio (100X)	Grado de motilidad	Escala de 1 a 5	Microscopio, placas porta y cubre objetos
Morfo anomalías	Conteo de espermatozoides normales y anormales (400X)	Porcentaje de espermatozoides con defecto	%	Microscopio, placas porta y cubre objetos tinción Eosina/Nigrosina
Integridad de la membrana	Mediante la prueba HOST, test demuestra la integridad funcional al permitir que los espermatozoides reaccionen en un medio hipo osmótico.	Porcentaje de espermatozoides que no reaccionan al medio hipo osmótico	%	Microscopio, medio hipo osmótico, placas porta objetos, tinción.
Integridad de la cromatina	Mediante la técnica de la fluorescencia	Porcentaje de espermatozoides sin daños en la cromatina	%	Contador digital de células LUNA FL

Nota: La tabla brinda la descripción de las variables dependientes.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo, nivel y métodos de investigación

La investigación es de tipo cuantitativa ya que se recopilo datos de los tratamientos aplicados (SpermFilter, centrifugación) para la separación de espermatozoides del plasma seminal en un semental y su posterior crio preservación, cuyas unidades experimentales fueron las pajillas crio preservadas y se utilizó un sistema informático (infostat) para el análisis de los datos obtenidos.

3.2. Localización y duración del experimento

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología animal de la Escuela superior Politécnica de Chimborazo, la misma que se encuentra ubicada en la Provincia de Chimborazo, en el Cantón Riobamba, con una duración del trabajo experimental de 60 días. Las condiciones experimentales del lugar donde se llevar a cabo la investigación se detallan en la tabla 4.

Tabla 4

Información climática de la ciudad de Riobamba

Clima/Temperatura:	
Altitud:	2.750 m.s.n.m
Temperatura:	12 °C
Humedad relativa:	81%
Clima:	Templado
Vientos (Dirección):	SE
Precipitación:	1421mm
Nubocidad (cielo cubierto):	6 octavos

Nota: Condiciones meteorológicas de la ciudad de Riobamba. Fuente: SIGMA, 2023.

Población y muestra

Se realizó el experimento con el eyaculado de un semental sexualmente experimentado, con edad mayor a 5 años, la unidad experimental fue una pajilla por método de separación de plasma seminal con 15 repeticiones evaluadas en tres colectas o tres eyaculados del mismo semental.

3.3. Técnica de recolección de información

3.3.1. *Método de colecta*

La colecta se material seminal se realizó mediante el uso de la vagina artificial rígida y una yegua en celo como estímulo para el semental.

La vagina artificial consta de un tubo rígido de 50 cm en cuyo interior está recubierta con una camisa de látex formando un doble fondo donde se introduce un litro de agua a 56º C y añadiendo presión con aire adicional para simular el tracto reproductivo de la hembra equina para de esta manera estimular la eyaculación.

Por medio de una camisa sanitaria, la vagina artificial está conectada a un termo en cuyo interior contiene in vaso colector donde se recolecta el material genético que consta de la fracción de gel y fracción seminal, las cuales son separadas mediante filtración.

Es preciso mencionar que la fracción seminal donde se encuentran los espermatozoides mismos que fueron objeto de este estudio.

3.3.2. *Evaluación de semen fresco*

Una vez obtenido la fracción seminal, una muestra de este fue apartado para luego en el laboratorio ser evaluados sus variables macroscópicas y microscópicas como se detallan en tablas a continuación:

Tabla 5

Variables macroscópicas del eyaculado fresco

Variables	Valor registrado
Volumen	90 ml
Color	Blanco lechoso
Olor	Sui generis
Aspecto	Cremoso
pH	7,5

Tabla 6

Variables microscópicas del eyaculado fresco

Variables	Valores registrados
Motilidad masal (%)	80
Motilidad individual (%)	80
Concentración espermática (epz/ml)	600000000
Vigor (grados)	4
Vitalidad (%)	90
Morfo anomalías (%)	11,33
Integridad de la membrana (%)	76,53
Integridad de la cromatina (%)	100

3.3.3. *Métodos de eliminación de plasma seminal*

El eyaculado fresco fue dividido en volúmenes iguales y se protegió en una dilución de 1:1 utilizando el diluyente comercial Ramplus para proceder a la separación del plasma seminal por los métodos de centrifugación y filtración (SpermFilter):

Método de filtración: para este método se utilizó un equipo comercial denominado SpermFilter el cual es un filtro de membrana sintética con porosidad que permite el paso del plasma seminal y de las bacterias, reteniendo únicamente los espermatozoides como se muestra en la figura 1.

Figura 1

Modo de uso del Spermfilter



El semen en dilución 1:1 es depositado en el filtro a continuación se realiza movimientos circulares permitiendo el paso del plasma seminal y obteniendo el pellet que queda sobre el filtro siendo esta la porción que contiene los espermatozoides. El pellet recuperado de la filtración es añadido al diluyente para congelación CrioRamp y se tomaron muestras para ser evaluados previo a la crio preservación (Tabla 7).

Tabla 7

Promedio de variables microscópicas post filtración

Filtrado					
Motilidad (%)	Vitalidad	Concentración Espermática (x106 /mL)	Morfo anomalías (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
87,33	86,67	426	5,5	80,97	98,83

Método de centrifugación: el material seminal en dilución fue dividido en tubos falcon de 12 ml. Mediante una centrifuga de ángulo fijo las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Este procedimiento permite que los espermatozoides se precipiten formando el pellet y sobre este el plasma seminal este último es eliminado ya que posee baja o nula cantidad de espermatozoides.

La porción del pellet luego se volverá a extender usando CrioRapm hasta una concentración final de 40 millones de espermatozoides/pajilla. Separando las muestras para su evaluación previo a la crio preservación (Tabla 8).

Tabla 8

Promedio de variables microscópicas post centrifugación.

Centrifugación					
Motilidad (%)	Viabilidad	Concentración Espermática (x106 /mL)	Morfo anomalías (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
86,67	86	445	14,34	77,53	76.38

3.3.4. *Crio preservación*

Una vez diluido el pellet fue empajilladas hasta lograr la concentración de 40 millones de espermatozoides/pajilla.

Las pajillas se sometieron a refrigeración a 4º C durante 3 horas.

A continuación, las pajillas son sometidas por primera vez a vapores de nitrógeno en una distancia de 6 cm del nivel de nitrógeno durante 6 minutos, en una segunda exposición a vapores de nitrógeno se redujo la distancia de exposición a 4cm y durante 4 minutos. Para finalmente ser sumergidos en nitrógeno líquido con una temperatura de -196 ºC. Posterior a esto se realizó la evaluación post crio preservación (Tabla 9).

Tabla 9

Promedio de variables microscópicas post congelación

TRATAMIENTO	Motilidad %	Viabilidad	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
Centrifuga	63,33	49,33	44,82	69, 17
SpermFilter	63,33	51,33	56,22	68,31

3.3.5. *Valoración de variables experimentales*

3.3.5.1. *Motilidad (%)*

Esta variable fue evaluada en espermatozoides una vez realizado la extracción del plasma seminal**,** medidas previo y posterior a la crio preservación. según lo detallado por Mancheno, (2022) con una micropipeta se tomó una microgota (5 µL) de semen diluido en una solución isotónica de NaCl- al 0,9% misma que fue colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37ºC y cubriéndolo con un cubreobjetos; la observación se la realizó en un microscopio óptico con un aumento de 40X, para la estimación se evaluó si más de la mitad de los espermatozoides que hay en el campo poseen movimiento o no, se observaron los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea, a los cuales se los considera normales, caso contrario, los que se mueven en círculo se consideraron anormales. El porcentaje se obtuvo de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo (normales) sobre el total de los espermatozoides observados en la placa.

3.3.5.2. *Viabilidad (%)*

Esta variable fue medida en pre y post congelacion, se utilizó el producto comercial BotuVital, se basa en la tinción de eosina-nigrosina, en la cual la nigrosina aumenta el contraste entre el fondo y las cabezas de los espermatozoides, facilitando la visualización. La eosina tiñe solo los espermatozoides muertos, tornándolos de color rosa oscuro, mientras que los espermatozoides vivos aparecen blancos.

Se prepara un frotis con una mezcla de 1 gota de semen fresco y 1 gota de BotuVital. Deje secar al aire (no lo seque sobre una placa calefactora) y examinar con aceite en un microscopio óptico (1000X). (Botupharma)

Los valores recopilados fueron aplicados en la siguiente formula:

Viabilidad (%) = (#Espermatozoides blancos / #Espermatozoides totales) x 100

3.3.5.3. *Concentración espermática (millones spz/ml)*

La concentración espermática hace referencia a la cantidad de espermatozoides presentes en un ml de eyaculado y para su cálculo se utiliza una cámara Neubauer, en la cual se utilizó una dilución de semen (1:100) en una solución formalizada distribuyéndolo en los compartimientos 21 de la cámara de conteo celular para su posterior conteo (5 cuadros) y cálculo con la siguiente fórmula (Tuaza, 2024).

La concentración de espermatozoides se calcula utilizando la siguiente ecuación:

Concentración espermática= $n\acute{u}mero\ de\ espermatozoides * 5 * 10 * 100 * 1000$

3.3.5.4. *Morfoanomalias (%)*

Se utilizó el producto comercial Botu vital en espermatozoides previo a la congelación. Esta solución para la evaluación espermática, basada en eosina-nigrosina, permite analizar la morfología espermática y la integridad de la membrana plasmática mediante microscopía óptica con un objetivo de inmersión de 100x (Botupharma). Para su evaluación se utilizó una gota de semen en pre y post congelado tiñéndola con una gota del colorante comercial, se realizó un frotis y se dejó secar la muestra.

Una vez lista la muestra fue llevada al microscopio con el objetivo a 40x y se realizó el conteo de espermatozoides totales en un lugar específico y mediante otro conteo en el mismo lugar se evaluó a los espermatozoides que tenían: cabeza grande, cabeza pequeña, sin cola, dos cabezas, dos colas, cola retorcida con el fin de determinar el total que presentaban estas anormalidades, los valores recopilados fueron aplicados en la siguiente formula:

Morfoanomalias (%) = (#Espermatozoides con anormalidades / #Espermatozoides totales) x 100

3.3.5.5. *Integridad de la membrana plasmática (%):*

La integridad de la membrana permite determinar la cantidad de espermatozoides viables después de la congelación en cada protocolo. Para la valoración se utilizó el test Hipo osmótico (HOST) que consistió en preparar una solución de fructosa al 1.7% (solución A) en 50ml de agua estéril y una solución de Citrato de Sodio al 0.735% (solución B) en 50ml de agua estéril. De la preparación total de cada solución se tomó 0.5ml de la solución (A) con 0.5ml de la solución (B), al que se le agrego una pajuela descongelada mezclándolos homogéneamente en un tubo eppendorf y se incubo durante 20 minutos en agua a 37°C.

Posterior a la incubación se tomó una muestra de 10 µL con la micropipeta para determinar en el microscopio el número de espermatozoides que tenían la cola enrollada y cabezas hinchadas que representan a aquellos que presentan membrana espermática íntegra (León, 2023).

A los datos obtenidos se les aplicó la siguiente formula:

Int. Membrana (%) = (#Espermatozoides con cola enrollada/#Espermatozoides totales) x 100

3.3.5.6. *Integridad de Cromatina (%)*

Se evaluó tanto en espermatozoides previo a la congelación como posterior a esta, para esto se preparó una muestra de 2 µL del fluorocromo Naranja de Acridina y 18 µL de semen descongelado; a continuación, se procedió a homogenizar la muestra para tomar con una micropipeta la cantidad de 10 µL y colocarlos en la placa del contador digital de células Luna Fl, el cual se encontraba calibrado y en modo de fluorescencia con naranja de acridina.

Las cabezas de los espermatozoides con ADN en estado nativo (intacto) emiten fluorescencia verde, mientras que aquellos, cuyo ADN se encuentra desnaturalizado se observan de color rojizo. Los resultados de este análisis fueron emitidos en porcentaje por el equipo mencionado (Mancheno, 2022).

3.4. Materiales y equipos

Materiales:

- Pipetas
- Puntillas
- Guantes
- Placas porta y cubre objetos
- Filtro de seme
- Tubos falcón
- Papel absorbente
- Overol

Equipos:

- Baño maría
- Microscopio
- Centrifuga
- Balanza
- SpermFilter
- Contador digital de células LUNA FL
- Platina calentadora
- Termómetro
- Botuflex

Reactivos:

- Diluyentes para refrigeración de semen equino (Ramplus)
- Diluyentes para crio preservación de semen equino (Crio-Ramp)
- Tensión eosina/nigrosina (Botu vital)
- Agua bidestilada
- Naraja de acritina

3.5. Técnicas de procesamiento, análisis y presentación de datos

3.5.1. *Tratamiento y diseño experimental.*

En la presente investigación se evaluó la viabilidad del semen equino crio preservado al utilizar distintos métodos de eliminación del plasma seminal. (Filtro, Centrifugación).

Las variables en estudio serán analizadas bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), los mismos que se ajustaron al siguiente modelo lineal aditivo:

Ecuación 1: *Diseño experimental.*

$$Yij = \mu + Ti + \in ij$$

Donde:

Yij = Observación del i – método de eliminación del plasma seminal
μ = Media general
Ti = Efecto fijo de i tratamiento
∈ij = Efecto del error experimental

3.5.2. *Esquema del experimento.*

Para el desarrollo de la presente investigación, la unidad experimental fueron una pajilla por método de separación de plasma seminal con 15 repeticiones evaluadas en tres colectas o tres eyaculados del mismo semental, según el esquema del experimento que se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Esquema del experimento.

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE*	REP./TRA.
SpermFilter	T1	15	1	15
Centrifugación	T2	15	1	15
Total				30

Nota: TUE: Tamaño de la Unidad Experimental (número de pajilla).

3.5.3. *Análisis estadístico y pruebas de significancia*

Los resultados experimentales de la presente investigación fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat, los datos fueron sometidos a los siguientes análisis:

- Prueba t de Student ($p < 0,05$) para las variables cuyos datos recogidos siguen una distribución normal.
- Wilcoxon rank-sum ($p < 0,05$) o también conocida como Mann-Whitney U para las variables cuyos datos recogidos no siguen una distribución normal.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTEPRETACIÓN DE RESULTADOS

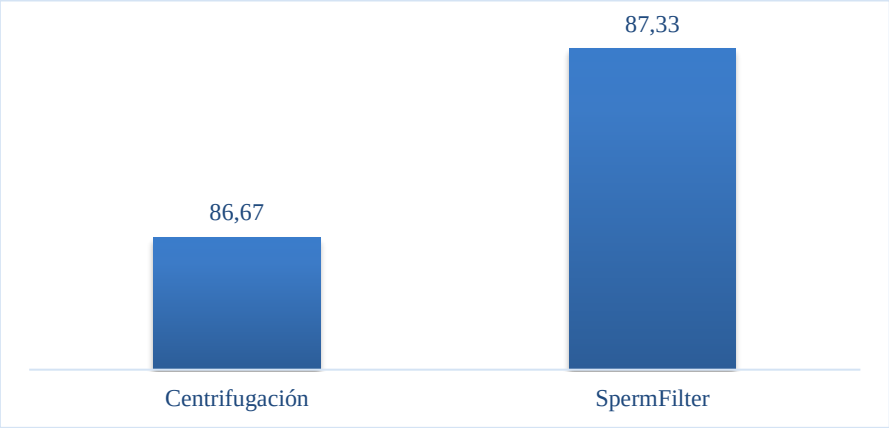
4.1. Análisis de variables pre congelación

4.1.1. *Motilidad%*

Al analizar la variable de motilidad espermática en la precongelación no se encontraron diferencias estadísticas significativas reportando una media de 86,67% +/- 4,88 para el semen centrifugado y 87,33% +/- 4,58 para el semen filtrado (Figura 2).

Figura 2

Motilidad pre congelación



Cabrera Saldaña (2024) evaluó el efecto de la suplementación con vitamina K y coenzima Q10 en el proceso de refrigeración del semen equino, utilizando la centrifugación a 800xg por 10 minutos como método de concentración espermática y adicionando los antioxidantes mencionados para en semen refrigerado en distintos tiempos, observando a la hora 0 un promedio para motilidad de 87.3% que en este caso era el mismo para el grupo control y los tratamientos. Estos resultados tienen similitud a los datos registrados en la presente investigación.

Contreras (2022) al evaluar dos protocolos de criopreservación de semen equino, observo que la Motilidad para semen poscentrifugación fueron de 66.67±8.16 y 64.17±7.36 para las fuerzas de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente, estos resultados no expresan diferencias estadísticas significativas.

Contrastando con Roach et al. (2016) quienes compararon la centrifugación con cojín y la filtración con SpermFilter en semen equino refrigerado registraron una media en motilidad de 70,2% y 67% en los respectivos métodos frente a un 70% del grupo control del que no se eliminó plasma seminal, la centrifugación amortiguada resultó ser un método superior para obtener espermatozoides progresivamente móviles en comparación con los grupos control ($P = 0,03$) y filtro ($P < 0,001$). No se observaron diferencias en la motilidad progresiva entre el grupo control y el grupo filtro ($P = 0,18$). No se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides normales y cabezas desprendidas entre los tres grupos ($P > 0,05$).

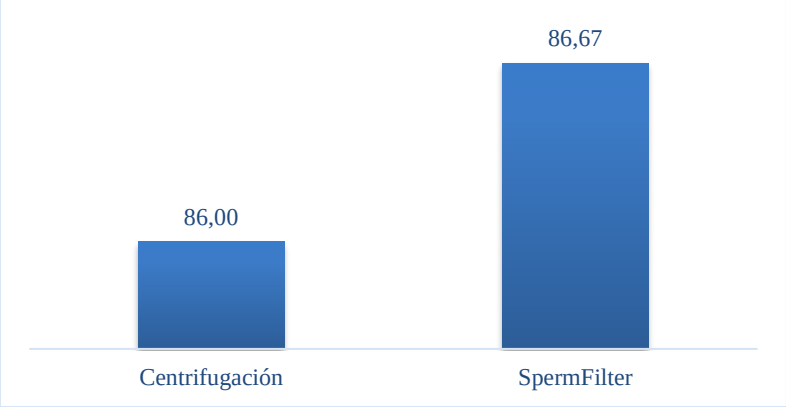
Por su parte Neto, Papa, Melo y Alvarenga (2013) al evaluar el efecto de la extracción de plasma seminal mediante un filtro de esperma sobre la viabilidad del semen de semental refrigerado, obtuvieron un promedio en motilidad de 71,7% para el grupo control (sin eliminar plasma seminal), mientras que para el filtrado y centrifugación una media de 72,3% y 68,2% respectivamente, evidenciando en este estudio una superioridad en el porcentaje de motilidad para método de filtración.

4.1.2. *Viabilidad, %*

Los resultados mostraron una media en viabilidad de 86% ± 5,7 para el método de centrifugado y de 86,67% ± 6,17 para las muestras seminales sometidas a SpermFilter. El análisis estadístico reporto que no existe diferencia estadisticas entre las muestras seminales sometidas tanto a centrifugacion como a filtrado.

Figura 3

Viabilidad espermática pre congelación.



Para evaluar la viabilidad, se utilizó el diluyente Botu Vital, que emplea la tinción eosina-nigrosina para diferenciar espermatozoides viables (sin tinción) de los no viables (se tiñen de rosa), lo cual es fundamental en evaluación seminal de campo. De acuerdo con Alvarenga et al. (2010), el uso de tinciones vitales permite evaluar la integridad de la membrana plasmática espermática, siendo esta una herramienta esencial para determinar la viabilidad de las células tras procesos de enfriamiento o congelación.

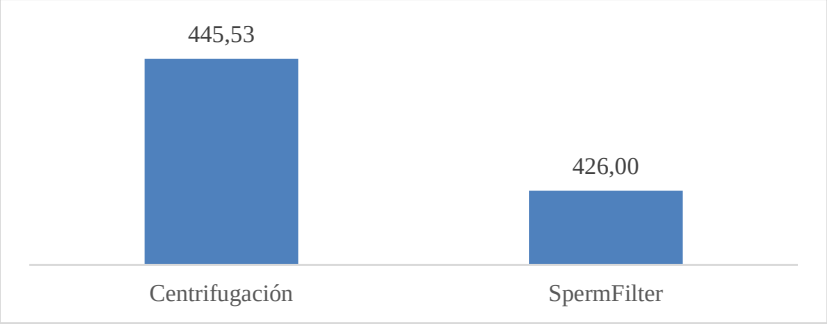
En su estudio con reproductores criollo colombiano, Restrepo-Betancur et al. (2016) dividieron las muestras de semen en cuatro grupos, aplicando centrifugaciones de 600, 1200 y 1800 ×g durante 10 minutos, comparadas con un grupo control sin centrifugar, registrando asi promedios de 48,1%, 47%, 45,9% y 54,4% respectivamente. Se puede observar que incluso a niveles bajos de fuerza de centrifugación existe alteración de la vitalidad espermática como indicador asociado con la funcionalidad de la membrana plasmática, parecería indicar una mayor tolerancia de esta estructura al estrés originado por la centrifugación en niveles inferiores a los 1800 x g.

4.1.3. *Concentración espermática*

Al evaluar el efecto de los métodos de eliminación del plasma seminal sobre la concentración espermática se obtuvo una media de 445,53 x10^6/ml para el grupo sometidos a centrifugación mientras que en el filtrado (SpermFilter) una media de 426,00 x10^6/ml, revelando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. La concentración obtenida mediante la centrifugación fue superior con respecto al método de filtrado, lo cual podría estar asociado a una mayor eficiencia en la recuperación de espermatozoides durante el proceso.

Figura 4

Concentración espermática pre congelación



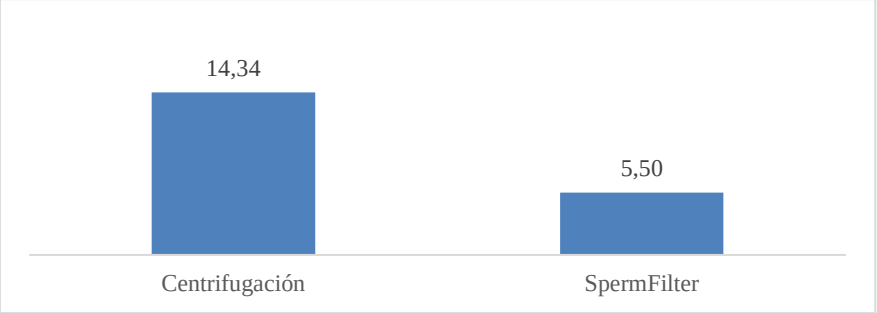
Al revisar la concentración espermática de eyaculado en fresco de 600 x10^6/ml podemos observar una tasa de recuperación de espermatozoides del 74,25% y 71% para los métodos de centrifugación y filtrado respectivamente. Estos resultados son inferiores a los descrito por Alvarenga et al. (2010) quienes en su trabajo "un nuevo método de filtración con filtro sintético" mostraron que estos métodos retienen casi todo el esperma registrando una tasa de recuperación del 95% y 92% en los dos métodos de filtración utilizados. Mientras que Roach et al. (2016) al comparar la centrifugación amortiguada y la filtración SpermFilter sobre la longevidad y la morfología del semen equino almacenado en frío, obtuvieron una tasa del 93% y 100% en cuanto recuperación espermática para la filtración y la centrifugación amortiguada respectivamente, evidenciando una mejore recuperación de espermatozoides cuando de utiliza la centrifugación amortiguada. Sin embargo, al comparar la centrifugación y el filtrado en la viabilidad del semen refrigerado se recuperó un mayor porcentaje de espermatozoides (P <. 05) al utilizar filtración (89,4 ± 7,4 %) en comparación con centrifugación (80,9 ± 5,5 %), siendo en este caso superior la tasa de recuperación para el método de filtrado (Neto, et al, 2013).

4.1.4. *Morfo anomalías, %.*

Se analizó el impacto sobre el porcentaje de morfo anomalías al utilizar la centrifugación y el filtrado (SpermFilter) como métodos de eliminación del plasma seminal, asi los resultados revelaron una media de 14,34% de morfo anomalías para el centrifugado y de 5,5% para el filtrado. Se observó una diferencia altamente significativa, lo cual nos permite suponer que el filtrado permitió recuperar espermatozoide con un porcentaje de morfo anormalidades significativamente menores que al utilizar la centrifugación (Figura 5)

Figura 5

Morfo anomalías pre congelación



Al evaluar el efecto de la vitamina K y la coenzima Q10 en la refrigeración de semen equino, Cabrera Saldaña (2024) extrajo el plasma seminal utilizando centrifugación a 800xg por 10 minuto y adiciono los antioxidantes mencionados, reportando que a la hora 0 se observaron un porcentaje de anormalidades de 5,07%, 5,84% y 5,08% para la vitamina K, la coenzima Q10 y el grupo control en el orden respectivo

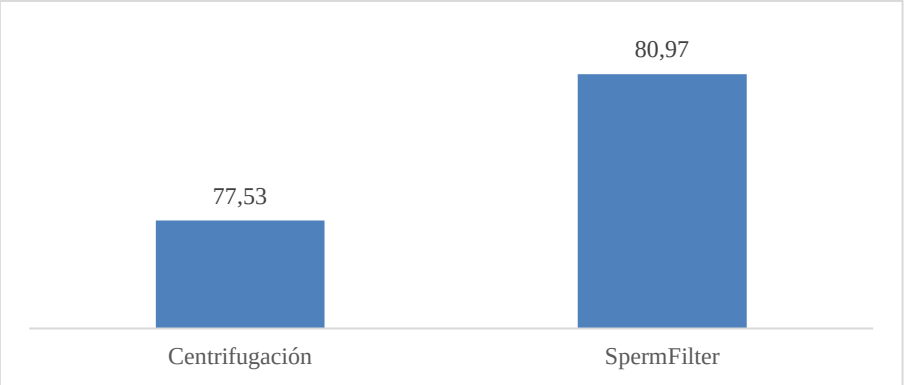
Roach et al. (2016) reportó que no se observaron diferencias estadísticas según la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney en cuanto al porcentaje de espermatozoides normales registrados al utilizar la centrifugación amortiguada y Sperm Filter como métodos de extracción de plasma seminal frente a un grupo control en semen refrigerado mostrando promedio de 73,8%, 70,8% y 70,7% respectivamente. En relación con el presente trabajo se puede inferir que los valores obtenidos son superiores debido a que la media de espermatozoides normales es de 85,66% para la centrifugación y de 94,5% para el filtrado mostrando una diferencia significativa entre los tratamientos.

4.1.5. *Integridad de la membrana plasmática, %*

Para evaluar el efecto del centrifugado y la filtración como todos de eliminación del plasma seminal sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Los resultados indican una media de 77,53% para el grupo sometido al centrifugado, mientras que para el filtrado presento una media de 80,97%, se pudo observar una diferencia entre medias de 3,44 puntos porcentuales entre los grupos, sin embargo, no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, no se puede afirmar existen superioridad entre los tratamientos aplicados para eliminar el plasma seminal en relación a esta variable.

Figura 6

Integridad de la membrana plasmática pre congelación



En el trabajo desarrollado por Neto et al, (2013) al evaluar el efecto de la extracción de plasma seminal mediante un filtro de esperma sobre la viabilidad del semen de semental refrigerado, para la variable de integridad de la membrana plasmática reportaron para el grupo control (sin extracción de plasma seminal) un promedio de 71,7% mientras que para el filtrado y centrifugación una media de 72.3% y 68,2% respectivamente. Presentando menores daños en la estructura celular con el uso del Spermfilter seguido del grupo control, esto resultados guardan similitud con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Alvarenga et al. (2010) demostraron que el uso de filtros para la concentración espermática mantiene la integridad de la membrana celular en niveles comparables a los obtenidos mediante centrifugación tradicional, registrando promedios de 68,5%, 71.5% y 68.0% para los tratamientos de centrifugado, filtración y grupo control (sin extracción de plasma seminal) lo que evidencia su viabilidad como alternativa práctica en campo.

Peláez Zhingri y Palacios Aguilar (2021) evaluaron el uso de L-carnitina en diluyentes lácteos para mejorar la crio supervivencia del semen equino, mostrando como los más altos promedios de 94,4% y 88,7% para los tratamientos de INRA con LC-50mM y UHT con LC-1mM respectivamente en la hora 0 de dilución del material seminal con los tratamientos mencionados.

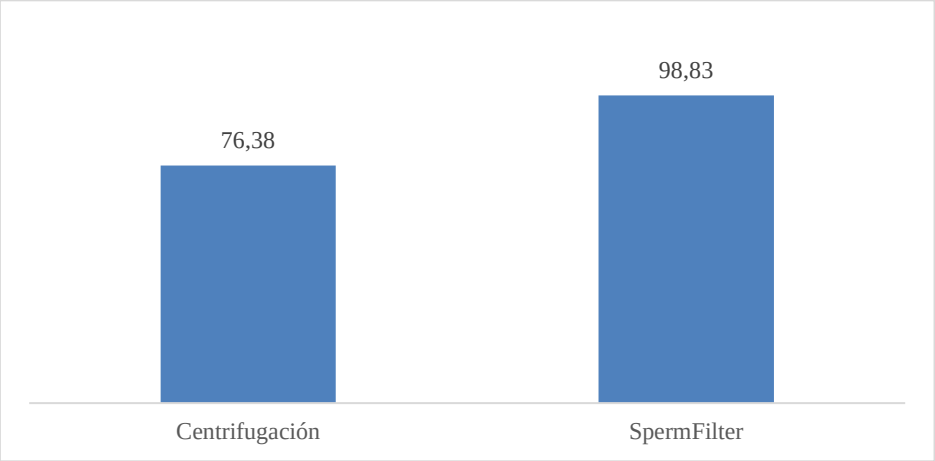
Según Bliss et al. (2012), la centrifugación amortiguada con volúmenes reducidos de fluido amortiguador (1ml y 3,5ml) y altas cargas espermáticas no afectó de manera significativa entre los tratamientos en cuanto a la integridad de membrana en semen equino refrigerado, reportando promedios de 69% en ambos volúmenes de amortiguadores frente a 77% del grupo control que no fue sometido a centrifugación.

4.1.6. *Integridad de la cromatina, %*

En cuanto a la integridad de la cromatina, se observó una diferencia altamente significativa entre los tratamientos. El grupo filtrado mostró una media de 98,83%, frente al 76,38% del grupo centrifugado, por lo cual podemos inferir que el filtrado provoca significativamente menores daños y lesiones a la integridad del ADN espermático en comparación con la centrifugación.

Figura 7

Integridad de la cromatina pre congelación



En el presente estudio, se observó que el grupo tratado mediante filtrado presentó un porcentaje significativamente mayor de integridad de la cromatina en comparación con el grupo centrifugado. Este hallazgo coincide con lo propuesto por Kumaresan et al. (2020), quienes argumentan que la integridad del ADN espermático es un componente crítico para predecir la fertilidad masculina, especialmente en especies de producción. Dichos autores sostienen que, a diferencia de los análisis seminales convencionales, los daños en el ADN pueden pasar desapercibidos, pero tienen un impacto directo en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano. En ese contexto, técnicas menos invasivas como la filtración podrían minimizar el daño oxidativo o mecánico al que se expone el esperma durante procesos como la centrifugación, lo que explicaría los mejores resultados en términos de cromatina observados en este trabajo. Asimismo, dado que los espermatozoides no atraviesan el proceso de selección natural en inseminaciones asistidas, garantizar la estabilidad del ADN resulta prioritario para optimizar los índices de preñez, tal como lo advierten los autores en su revisión. La calidad del ADN espermático, también conocida como integridad de la cromatina, es un indicador crucial de la capacidad fecundante del semen, ya que refleja el grado de compactación y protección del material genético.

En un estudio realizado por Bliss et al. (2012), se evaluó esta variable utilizando el parámetro COMP-αt (Comet Assay or SCSA-derivative), el cual permite detectar daños en la estructura del ADN espermático. Los resultados indicaron que ninguno de los protocolos de centrifugación amortiguada utilizados afectó significativamente la calidad del ADN, ni de

forma inmediata (0 h) ni tras 24 horas de almacenamiento a 5 °C. Tanto el volumen del fluido amortiguador (1 mL vs. 3,5 mL) como la carga espermática por tubo (1×10^9 vs. 3×10^9 espermatozoides) no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) respecto a la integridad del ADN.

4.2. Análisis de variables post congelación

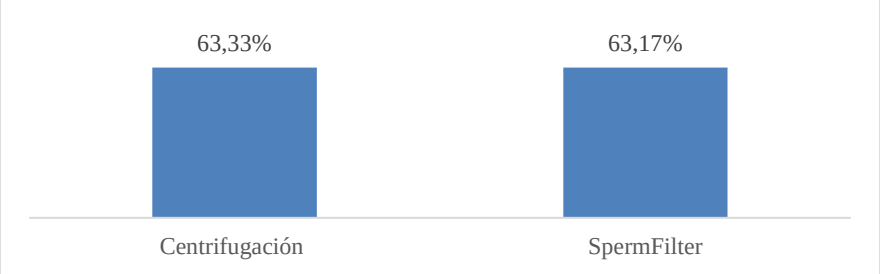
4.2.1. *Motilidad, %*

En cuanto a la motilidad espermática, los resultados indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de centrifugado y filtrado. La media de motilidad fue similar en ambos grupos con 63,33% para centrifugado y 63,17% para filtrado.

En base a estos resultados podemos sugerir que, ningún tratamiento alteró de forma significativa la capacidad en la motilidad de los espermatozoides. Este hallazgo puede deberse a que ambos métodos de procesamiento, aunque diferentes, no ejercen un impacto considerable sobre esta característica funcional, a diferencia de otras variables como la integridad de la cromatina, que sí mostró cambios significativos.

Figura 8

Motilidad espermática post congelación



Contreras (2022) evaluó dos protocolos de criopreservación de semen equino y concluyó que la centrifugación a 750 g durante 8 minutos permitió una mayor sobrevivencia espermática posdescongelación, sin diferencias significativas en la motilidad progresiva, los resultados obtenidos fueron para el semen descongelado de 70,83±10,21 y 71,67±10,80 para fuerzas de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente. Por su parte Gary y Dean (2009) tampoco encontraron diferencias entre sus fuerzas de centrifugación empleadas, en cuanto a la Motilidad, no obstante, sus resultados son muchísimos más bajos, no mayores al 25%.

Proaño Cruz (2025) desarrolló un estudio en el que evaluó el efecto de diferentes técnicas de resuspensión espermática sobre la calidad del semen equino posdescongelación en ejemplares de distintas razas. En relación con la motilidad individual, se observó que el Caballo Colombiano presentó el valor más alto (42,00%), mientras que el Caballo Árabe registró el más bajo (20,00%), existiendo diferencias altamente significativas entre ambos.

Por su parte, el Caballo Español alcanzó un valor intermedio (31,00%), aunque significativamente menor en comparación con el colombiano. Estas variaciones sugieren una mayor susceptibilidad de la membrana espermática de los ejemplares Árabes y Españoles al daño inducido por la criopreservación, lo que repercute negativamente en la movilidad espermática.

En el estudio desarrollado por Contreras (2022) cuando evaluó dos protocolos de criopreservación de semen equino en los parámetros de Motilidad para el semen descongelado fueron 70.83±10.21 y 71.67±10.80 para fuerzas de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente, estos resultados no expresan diferencias estadísticas significativas, sin embargo, se evidencia que existe superioridad entre los datos observados por Contreras en relación al presente estudio.

En el estudio de Caldevilla et al. (2020), se observó que la movilidad total de los espermatozoides equinos pos-descongelados fue significativamente mayor ($p<0,05$) en los tratamientos que incluyeron yema de huevo en el medio de congelación, en comparación con los tratamientos con AndroMed®, un diluyente a base de lecitina de soja registrando medias de 36% y 17% repectivamente. Los autores plantean que la curva rápida de congelación empleada en su protocolo, así como la composición del diluyente, podrían haber influido negativamente en la eficacia crioprotectora de AndroMed®.

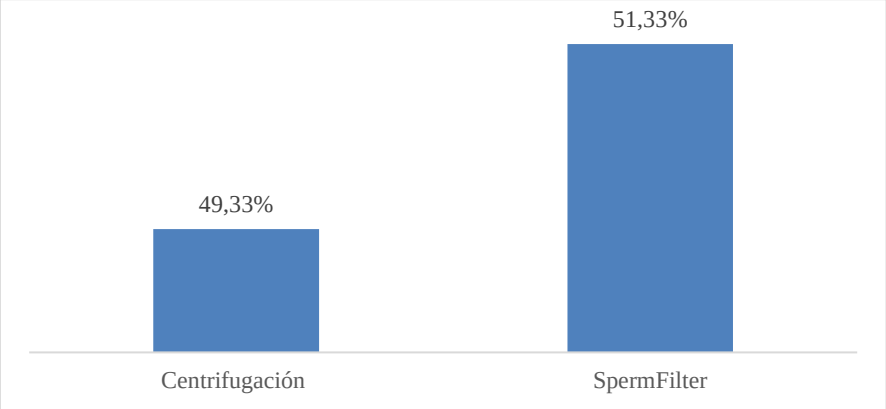
4.2.2. *Viabilidad, %*

Respecto a la viabilidad espermática post-congelación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados, según los resultados de la presentaron medias de 49,33% en el grupo centrifugado y 51,33% en el grupo filtrado, lo cual sugiere que el tipo de procesamiento previo al congelamiento no influyó significativamente sobre la viabilidad celular tras la descongelación (Figura 9).

La sobrevivencia espermática depende de muchos factores, entre ellos los importantes son los cambios de temperatura y alteraciones de la membrana del espermatozoide, no obstante, los espermatozoides equinos luego de la posdescongelación en promedio pueden sobrevivir el 50 % de ellos (Clavijo, 2015).

Figura 9

Viabilidad espermática post congelación



Contreras (2022) menciona que las tasas de sobrevivencia posdescongelación fue de 46.67±8.16 y 56.67±8.16 para la combinación de fuerzas centrifugas y tiempo de 600 g por 11 minutos y 750 g por 8 minutos respectivamente. Esta última revela una mayor tasa de sobrevivencia estadísticamente significativa.

En relación con la viabilidad espermática e integridad acrosomal, Caldevilla et al. (2020) reportaron que los tratamientos que contenían yema de huevo presentaron un mayor porcentaje ($p<0,05$) de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y vivos con acrosoma reaccionado, en comparación con los tratamientos con AndroMed®. En contraste, los diluyentes a base de lecitina de soja mostraron porcentajes significativamente más altos de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado.

Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la yema de huevo, por su contenido de lipoproteínas, brinda una protección superior a la membrana acrosomal durante el proceso de criopreservación. Asimismo, las diferencias encontradas podrían estar influenciadas por la curva rápida de congelamiento utilizada en el protocolo, la cual podría no ser la más adecuada para diluyentes libres de proteínas animales como AndroMed® (Caldevilla et al., 2020).

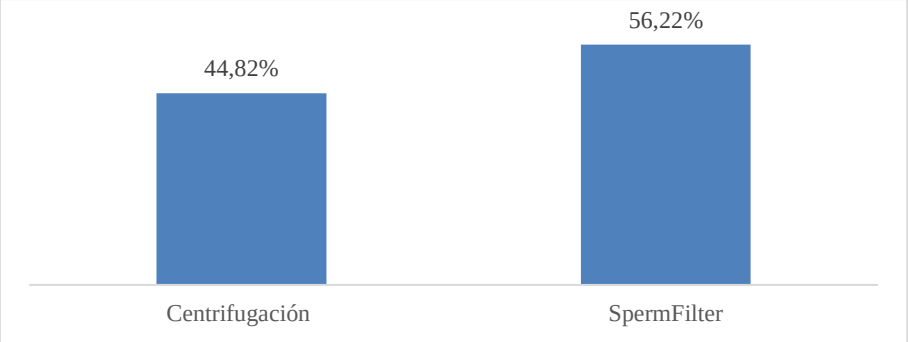
4.2.3. *Integridad de la membrana plasmática, %*

En cuanto a la integridad de la membrana plasmática, se observó una diferencia significativa entre los tratamientos. El grupo filtrado presentó una media superior con relación al centrifugado con 56,22% y 44,82% respectivamente. En la valoración estadística nos mostró que existen diferencias altamente significativas.

Los resultados sugieren que el tratamiento por filtrado podría influir significativa la integridad de la membrana plasmática espermática respecto al centrifugado cuando se someten a los espermatozoides a procesos de crio preservación.

Figura 10

Integridad de la membrana plasmática post congelación



Cedeño (2012) destaca que la integridad de la membrana plasmática es fundamental para la viabilidad espermática y que esta puede verse significativamente afectada por factores como el estrés térmico y osmótico. Además, señala que razas con adaptaciones a climas extremos, como el caballo árabe, presentan membranas más resistentes, lo cual explicaría los valores superiores observados en esta raza. También añade que la centrifugación a 1500 rpm es una técnica eficaz para preservar la integridad de la membrana, al minimizar el daño mecánico durante el proceso.

Al evaluar de 3 protocolos de crioconservación de semen equino, Leon (2023), reportó para la variable Integridad de la membrana espermática (%) que se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en donde el mejor resultado obtuvo el T3 con un 50,07% seguido del T2 con 41,50% y finalmente el T1 con un 25,43% resultados que guardan cierta similitud con los obtenidos en la presente investigación posiblemente porque no se utilizaron los mismos protocolos de extracción de plasma seminal.

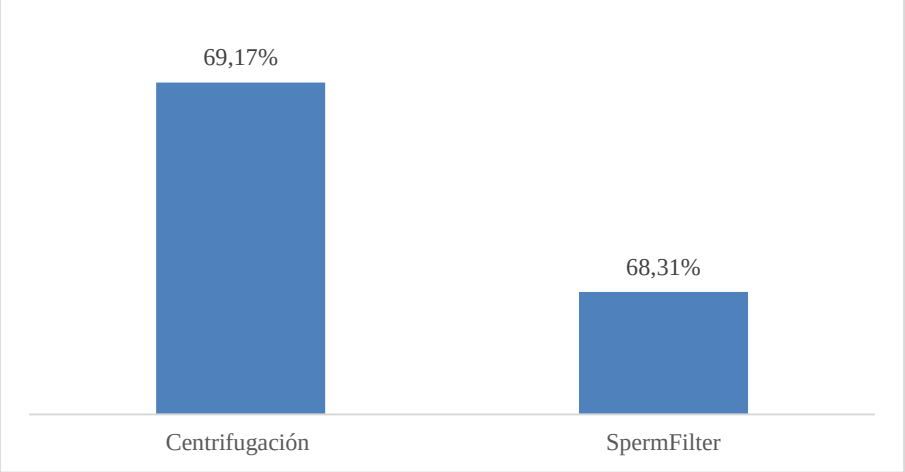
La integridad de la membrana espermática es un factor crítico para mantener la viabilidad celular, ya que su alteración compromete directamente la funcionalidad del espermatozoide. En este contexto, Proaño Cruz (2025) reportó que los espermatozoides de la raza Árabe presentaron una menor integridad de membrana (65%) en comparación con los de las razas Colombiana (75%) y Española (72%), observándose una diferencia estadísticamente significativa (P = 0.0045). El autor sugiere que el proceso de congelación-descongelación afecta de manera desigual a las distintas razas, siendo los espermatozoides del Caballo Árabe particularmente más susceptibles. Entre las posibles explicaciones para este fenómeno se encuentran diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática, que podrían hacerla más propensa al daño inducido por el enfriamiento, así como una menor capacidad antioxidante inherente a esta raza, lo que favorecería procesos de peroxidación lipídica y el consiguiente deterioro estructural de la membrana celular.

4.2.4. *Integridad de la cromatina*

En cuanto a la integridad de la cromatina espermática, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El grupo sometidos a centrifugación presentó una media de 69,17%, mientras que el grupo de filtración alcanzó 68,31%. Estos resultados indican que la integridad de la cromatina no se ve afectada de manera significativa por el tipo de tratamiento utilizado.

Figura 11

Integridad de la cromatina post congelación



Heidari Nasirabadi et al. (2019), es su trabajo "*La sericina mejora el estado de capacitación y la integridad de la cromatina de los espermatozoides de semental congelados-descongelados al reducir el estrés oxidativo*" observo que el porcentaje de espermatozoides con estructura de ADN normal fue significativamente mayor en el grupo suplementado con sericina (85%) en comparación con los otros grupos ($p < 0,05$). Siendo resultados superiores a los obtenidos en nuestro trabajo, esto podría estar relacionado con la adición de antioxidantes al medio de congelación como una estrategia para reducir los efectos destructivos de las radicales de oxígeno en los espermatozoides.

López y Lituma (2024) evaluaron el efecto del resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos sometidos a congelación y vitrificación. En su estudio, observaron que los tratamientos de vitrificación, tanto con resveratrol (35%) como sin él (48%), generaron porcentajes significativamente menores de espermatozoides con ADN fragmentado (indicador de cromatina condensada) en comparación con los tratamientos de congelación tanto con uso de resveratrol (55%) y control (75%) ($P < 0,05$). Los resultados de nuestro trabajo son superiores encuanto al uso del resvetarol para congelación, pero también son inferiores al tratamiento control. Podría ser debido losprotocols para crio congelación son diferentes y también puede estar influida por el factor individual de cada animal.

4.3. Comprobación de hipótesis o ideas a defender

Al evaluar el efecto de dos métodos de extracción de plasma seminal en la viabilidad de semen equino para crio conservación, en los resultados del análisis estadístico en pre congelación no se observan diferencias significativas para variables de motilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática a pesar de la superioridad numérica del método de filtración (Sperm Filter) frente al centrifugado, por otra parte, se evidencia que en la centrifugación se obtuvo una concentración espermática significativamente mayor por lo que podemos inferir que este método fue más eficiente en la recuperación de espermatozoides.

Sin embargo, el porcentaje de morfo anomalías registrado fue sinificativamente menor para el método de filtrado, podría deberse a que en este método resulta menos agresivo y retiene en mayo proporción espermatozoides normales.

De la misma manera en cuanto a la integridad de la cromatina el uso del filtro demostró ser significativamente superior, reforzando la hipótesis de que con este método se provoca menos daño celular y obtenemos espermatozoides en mejores condiciones en procesos previos a la crio conservación.

Tabla 11

Promedios de variables evaluadas pre congelación y sus grados de significancia.

Tratamiento	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Concentración Espermática (x10^6 /mL)	Morfo anomalías (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
Filtrado	87,33	86,67	426	5,5	80,97	98,83**
Centrifugado	86,67	86	445**	14,34**	77,53	76.38

Nota. **= variables que significativamente mostraron superioridad.

Al evaluar la calidad espermática pos congelación no se observaron diferencias estadísticas en la variable motilidad, viabilidad e integridad de la cromatina, sin embargo, se reportó una superioridad significativa en cuanto a la integridad de la membrana plasmática con el uso del filtro. Estos resultados pueden deberse a también al proceso de crio conservación asi como efecto del semental.

Tabla 12

Promedios de variables evaluadas post congelación y sus grados de significancia.

TRATAMIENTO	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
Centrifuga	63,33	49,33	44,82	69, 17
SpermFilter	63,33	51,33	56,22**	68,31

Nota. **= variables que significativamente mostraron superioridad.

CONCLUSIONES

- La eliminación del plasma seminal previo al proceso de criopreservación mejoró significativamente la viabilidad espermática post-descongelación, lo que evidencia su papel crítico en la protección de los espermatozoides frente a daños por estrés osmótico, oxidativo y criogénico.
- El método de filtrado con SpermFilter mostró ventajas significativas frente a la centrifugación, al preservar de forma más efectiva la integridad de la membrana plasmática y reducir el porcentaje de morfoanomalías, lo que se traduce en espermatozoides con mayor capacidad funcional.
- En lo que respecta a la integridad de la cromatina espermática, los tratamientos con SpermFilter reflejaron mejores valores en comparación con la centrifugación, lo cual sugiere un menor daño al ADN nuclear y mayor estabilidad del material genético, aspecto fundamental para lograr una fertilización exitosa.
- Si bien la concentración espermática fue superior en el grupo sometido a centrifugación**,** esta diferencia no fue suficiente para contrarrestar el mayor grado de alteraciones morfológicas y estructurales observadas en ese grupo.
- Por tanto, el SpermFilter se presenta como una alternativa viable, eficiente y menos lesiva que la centrifugación tradicional, siendo especialmente recomendable en casos donde se prioriza la calidad estructural del espermatozoide más allá de la cantidad recuperada.

RECOMENDACIONES

- Adoptar el uso del SpermFilter como técnica preferente de eliminación de plasma seminal en protocolos de criopreservación de semen equino, particularmente en sementales con antecedentes de baja motilidad o alta sensibilidad a procesos de estrés mecánico.
- Incorporar de manera sistemática la evaluación de la integridad de la cromatina espermática, mediante métodos como la tinción con naranja de acridina, en los análisis de calidad seminal, dada su relevancia como predictor de éxito reproductivo.
- Realizar estudios complementarios que integren ensayos de fertilidad in vivo, mediante inseminaciones artificiales controladas con semen tratado por ambos métodos, con el fin de correlacionar los parámetros in vitro con los resultados reproductivos reales.
- Capacitar al personal técnico de los centros de reproducción equina en buenas prácticas de manipulación seminal**,** incluyendo técnicas de filtración, manejo aséptico y control de temperatura, con el fin de minimizar el daño inducido por el operador durante las fases críticas del procesamiento.
- Profundizar en investigaciones sobre la optimización del SpermFilter**,** explorando variables como el tiempo de filtración, tipos de membrana y combinación con antioxidantes, lo cual permitiría perfeccionar aún más su aplicación en diferentes razas equinas y condiciones reproductivas.

BIBLIOGRAFÍA

Abril, A., Barragán, A. (2023). *Manejo Reproductivo de Equinos en un Criadero de la Sabana de Bogotá*. [Universidad Antonio Nariño]. Disponible en: http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/9274.

Álvarez, C. (2020). *Nuevas estrategias para mejorar la calidad espermática en la criopreservación de la especie equina*. UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. Recueperado de: https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=293585&utm_source=chatgpt.com

Alvarenga, M. A., Melo, C. M., Magalhães, L. C. O., & Papa, F. O. (2010). A new method to concentrate equine sperm. *Animal Reproduction Science, 121*(Suppl. 1), S186–S187. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.142

Alvarenga, M. A., & Segabinazzi, L. G. T. M. (2021). *Uso de un filtro de esperma*. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil. [Editado por John Dascanio y Patrick McCue. © 2021 John Wiley & Sons, Inc. Publicado en 2021 por John Wiley & Sons, Inc].

Al-Essawe, E. M., Wallgren, M., Wulf, M., Aurich, C., Macías-García, B., Sjunnesson, Y., & Morrell, J. M. (2018). Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology, 115*, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.021

Botupharma. (s.f.). *BotuVital – Vital staining for stallion semen*. Recuperado el [26 de junio de 2025], de https://botupharmausa.com/botuvital/

Cabrera Saldaña, J. C. (2024). *Evaluación de la vitamina K y coenzima Q10 en la refrigeración de semen equino* [Tesis de grado, Universidad Católica de Cuenca]. Universidad Católica de Cuenca.

Caldevilla, M., Ferrante, A., & Neild, D. (2020). *Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino*. Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Cátedra de Teriogenología

Carvalho, M. M., Silva, A. L., & Almeida, F. C. (2022). Advances in equine semen evaluation: Motility and morphology parameters. *Theriogenology,* 178, 103-112**.**

Cedeño, N. (2012). La investigación mixta, estrategia andragónica fundamental para fortalecer las capacidades intelectuales superiores. Recuperdo de: https://biblio.ecotec.edu.ec/revista/edicion2/revista_completa.pdf

Contreras, F. A. (2022). *Evaluación de dos protocolos de criopreservación de semen equino* [Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá]. Repositorio Institucional Digital - Universidad de Panamá. http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/6831

Cladevilla, M. (2020). *Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias., Argentina. (Vol. 22, Núm. 1). https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179171136006

Clavijo, L., & Caiza, F. (2015). *Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años* [Tesis de licenciatura, Universidad San Francisco de Quito]. Universidad San Francisco de Quito. https://scispace.com/pdf/evaluacion-de-los-diluyentes-comerciales-en-el-proceso-de-63gkmi26ev.pdf?utm_source=chatgpt.com

Evenson, D. P., Larson, K. L., & Jost, L. K. (2002). Análisis de la estructura de la cromatina espermática: su uso clínico para la detección del ADN espermático fragmentado en la infertilidad masculina y comparaciones con otras técnicas. *Revista de Andrología, 23*(1), 5–13.

Fernández, J., Morales, L., & García, R. (2021). Advances in cryopreservation techniques of stallion semen: Impact of seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, 95, 103-110. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103110

Fernández, M., Torres, L., & Pérez, R. (2021). Advances in stallion semen cryopreservation: The role of controlled freezing techniques. *Theriogenology*, 163, 118-124. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.001

Fernández, M., Rodríguez, P., & Sánchez, L. (2021). Aplicación de la naranja de acridina para la evaluación de la integridad del ADN en espermatozoides equinos. *Revista Iberoamericana de Reproducción Animal*, 38(1), 15-24. https://doi.org/10.1016/j.rira.2021.01.003

García, F., Torres, A., & Rodríguez, M. (2022). Evaluación comparativa de métodos para separación de plasma seminal en semen equino. *Journal of Equine Reproduction*, 15(2), 110-118. https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa153

García, J., Sánchez, M., & López, A. (2021). Genetic resource management in equine reproduction: Current trends and future perspectives. *Animal Reproduction Science*, 230, 106749. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106749

García, M., & López, F. (2021). Técnicas actuales para la conservación del semen equino: Refrigeración y congelación. *Revista Latinoamericana de Reproducción Animal*, 29(1), 12-22. https://doi.org/10.1234/rlaa.v29i1.2021

García, P., Sánchez, L., & Fernández, R. (2023). Oxidative stress and its impact on equine sperm quality: Fluorescence-based detection methods. *Theriogenology*, 185, 34-42. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.12.003

Garzón, S. (2023). *Evaluación de dos diluyentes comerciales botucrio® e inra96 mediante el proceso de crio preservación de celulas espermaticas en caballos arabe y criollo de 4 a 5 años – en la provincia de Cotopaxi cantón Latacunga.* UTC. Latacunga. 59 p.

Gómez, J., Rivera, S., & Morales, D. (2023). Maduración espermática y modificaciones cromatínicas en sementales: implicancias para la reproducción asistida. *Animal Reproduction Science*, 255, 107348. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107348

González, F., Morales, P., & Ramírez, H. (2022). Efficiency of biocongelators in stallion semen freezing protocols. *Journal of Equine Veterinary Science*, 108, 103809. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103809

González, R., Martínez, F., & López, D. (2022). Evaluación comparativa de técnicas fluorescentes para la detección de daño en la cromatina espermática. *Journal of Andrology and Reproductive Biology*, 45(2), 89-98. https://doi.org/10.1016/j.jarb.2022.03.004

González, R., Fernández, P., & Morales, J. (2022). Factores críticos en el manejo seminal para la reproducción equina. *Journal of Equine Science*, 33(3), 145-155. https://doi.org/10.5678/jes.v33i3.2022

Gonzáles, M., Rodríguez, C., Oropeza, A., Wong, Y., Llanos, J. and Gonzáles, H. (2015). Uso del plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de equinos. Revista de investigaciones veterinarias del Perú, [online] (Vol. 26, Núm. 2), p.352.

González-Castro, M. et al. (2024). *Cryopreservation of equine spermatozoa reduces plasma membrane integrity and phospholipase C zeta 1 content as associated with oocyte activation*. *Andrology*. Disponible en: Wiley Online Library

Gutiérrez, L. (2014). *Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Heidari Nasirabadi, M., Shirazi, A., Kadivar, A., Shams-Esfandabadi, N., Mohebbi, A., & Ahmadi, E. (2019). La sericina mejora el estado de capacitación y la integridad de la cromatina de los espermatozoides de semental congelados-descongelados al reducir el estrés oxidativo. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 11*(3), 245–252

Hernández, A., Torres, F., & López, M. (2020). Aplicación de técnicas fluorescentes en la evaluación de semen equino: avances y perspectivas. *Revista Latinoamericana de Medicina Veterinaria*, 12(3), 145-156. https://doi.org/10.18004/rlmv.2020.12.3.145

J. Roach, M. Schnobrich, R. Ellerbrock, L. Feijo, E. Bradecamp, MA Alvarenga, K. Kline,I. Canisso. (2016). Comparación de centrifugación amortiguada yFiltro de esperma filtración sobre la longevidad yMorfología del semen equino almacenado e. *Https://Www.Researchgate.Net/Deref/Http%3A%2F%2Fgroup.Bmj.Com%2F?_tp=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6Il9kaXJlY3QiLCJwYWdlIjoicHVibGljYXRpb24ifX0*, *2016*, 1–5. https://doi.org/10.1136/vr.103607

Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). Integridad del ADN del esperma y fertilidad masculina en animales de granja: una revisión. *Frontiers in Veterinary Science, 7*, 321. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321

León, L. (2023). *Evaluación de 3 protocolos de crioconservación de semen equino anglo árabe y pura sangre inglés (psi) en la Estación Experimental Tunshi de la Espoch. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. Riobamba. Recuperado de: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/20983

López, A., Pérez, J., & Morales, T. (2023). Uso de citometría de flujo y naranja de acridina en el diagnóstico seminal de reproductores equinos. *Animal Reproduction Science*, 252, 107222. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107222

López Miranda, P. M., & Lituma Piña, M. E. (2024). *Efecto del resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos congelados y vitrificados* [Tesis de grado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional Universidad de Cuenca. https://dspace.ucuenca.edu.ec/

López, M., Rivera, P., & González, S. (2021). Evaluación de viabilidad espermática mediante tinción con SYBR-14 y propidio ioduro en caballos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 95, 103237. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103237

López, S., Martínez, V., & Castillo, A. (2023). New formulations of extenders for improved equine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(2), 213-220. https://doi.org/10.1111/rda.14215

López, S., Martínez, C., & Fernández, D. (2022). Impact of cryoprotectants and freezing rates on equine sperm viability. *Cryobiology*, 105, 28-35. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.05.004

Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, *76*(3), 547–557. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.005

Mancheno, A. & Andino, P. & Villafuerte, (Julio - diciembre de 2022). Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática del semen. Sathiri (17),2 103-117. https://doi.org/10.32645/13906925.1133

Martínez, L., & Pérez, A. (2020). Impacto del plasma seminal en la motilidad de semen refrigerado en caballos. *Theriogenology Research*, 8(4), 230-239. https://doi.org/10.1016/j.therires.2020.03.007

Martínez, C., Gómez, D., & Ramírez, F. (2022). Effect of temperature and dilution rate on equine semen cryopreservation outcomes. *Theriogenology Research*, 10(3), 45-53. https://doi.org/10.1016/j.therires.2022.04.005

Martínez, L., Fernández, R., & López, S. (2023). Assessment of sperm DNA fragmentation in stallions: Comparative study of centrifugation and membrane filtration techniques.

Animal Reproduction Science, 250, 107196. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107196

Martínez, L., Gómez, P., & Torres, F. (2021). Relación entre la integridad de la cromatina y parámetros seminales en caballos reproductores. *Journal of Equine Veterinary Science*, 101, 103432. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103432

Martínez, L., Rivera, J., & Morales, D. (2022). Detección de apoptosis espermática mediante anexina V y técnicas de fluorescencia en reproductores equinos. *Animal Reproduction Science*, 242, 106851. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106851

Martínez, L., Silva, J., & Fernández, R. (2021). Optimizing membrane filtration methods to improve stallion semen quality. *Cryobiology*, 96, 90-97. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.008

Martínez, V., Rodríguez, P., & Castillo, J. (2020). Optimization of stallion semen cryopreservation: Effects of freezing rate on sperm quality. *Theriogenology Research*, 8(3), 45-52. https://doi.org/10.1016/j.therires.2020.04.007

Medica, A. J., Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2024). *Optimizing equine sperm quality: an alternative to single layer centrifugation for sperm isolation*. *Reproduction and Fertility, 5*(4), e230081. https://doi.org/10.1530/RAF-23-0081

Montoya, G. R. J. C. (2016). *Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos.* Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 119–124.

Morales, E., Ríos, G., & Mancheno, C. (2011). *Reproducción equina*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias.

Morrell, J. M. (2011). Artificial insemination in horses: How to improve the results. *Veterinary Medicine International, 2011*, 1–9. https://doi.org/10.4061/2011/575292

Orsolini, M. F., Meyers, S. A., & Dini, P. (2021). An update on semen physiology, technologies, and selection techniques for the advancement of in vitro equine embryo production: Section I. *Animals, 11*(11), 3248. https://doi.org/10.3390/ani11113248

Pasch, L. (2024). *Stallion semen cryopreservation: Frozen semen preparation, handling and breeding*. *Equine Veterinary Education*. Recuperado de: beva.onlinelibrary.wiley.com

Peláez Zhingri, G. M., & Palacios Aguilar, M. P. (2021). *Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino* [Tesis de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia].

Peña, F. J. (2024). Proteomics is advancing the understanding of stallion sperm biology. *Proteomics, 24*(14), 2300522. https://doi.org/10.1002/pmic.202300522

Pérez, D., López, S., & García, J. (2023). Morphological effects of membrane filtration on stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 245, 107107. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107107

Pérez Q., D. D., Acosta L., M., Restrepo B., G., Camacho, C., & Pérez O., J. (2017). *Congelación de Semen Equino Bajo Dos Esquemas de Adición de Dimetilformamida*. Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru, 28(4), 918–927. Disponible en: https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13884

Pereira, R. (2023). *Gradiente de densidade coloidal EquiPure utilizado pré e pós criopreservação de sêmen equino* / Raiza Rocha Pereira. - Botucatu, 2023. Disponible en: https://repositorio.unesp.br/items/266b4c79-e356-4c93-a0ad-70477c3ac044

Proaño Cruz, M. E. (2025). *Evaluar las técnicas de resuspensión espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato]. Universidad Técnica de Ambato.

Restrepo-Betancur, G., Cantero-Nanclares, J. M., & Montoya-Paéz, J. D. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 14*(1), 119–125. https://revistas.itm.edu.co/index.php/BSAA/article/view/609

Rodríguez, F. (2023). *Comparación De Los Dos Diferentes Tipos De Congelación En Equinos* (Monografia). [Universidad Antonio Nariño] disponible en: http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/9278.

Rodríguez, S., Torres, M., & Castillo, E. (2023). Manejo y dilución del semen equino: Prácticas actuales y recomendaciones. *Veterinary Reproduction*, 37(2), 77-89. https://doi.org/10.1016/j.vetrepro.2023.02.002

Rodríguez, M., Pérez, A., & López, S. (2022). Effects of oxidative stress on stallion spermatozoa and strategies for its mitigation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 108, 103793. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103793

Rodríguez, P., Torres, G., & Silva, M. (2023). Temperature management during stallion semen freezing protocols. *Veterinary Reproduction*, 38(1), 15-23. https://doi.org/10.1016/j.vetrepro.2023.01.004

Rodríguez, P. (2023). Innovaciones en criopreservación de semen equino: Biocongeladores y sus aplicaciones. *Revista de Medicina Veterinaria*, 74(1), 15-23.

Roach, J., Schnobrich, M., Ellerbrock, R., Feijo, L., Bradecamp, E., Alvarenga, M. A., Kline, K., & Canisso, I. (2016). *Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen*. *Veterinary Record, 178*(10), 241. https://doi.org/10.1136/vr.103607

Santos, J., Hernández, V., & Navarro, L. (2022). Uso de antibióticos en diluyentes seminales equinos: Impacto en motilidad y viabilidad. *International Journal of Animal Reproduction*, 19(5), 305-315. https://doi.org/10.1016/j.ijar.2022.07.005

Santos, J., Pereira, L., & Carvalho, F. (2020). Optimization of centrifugation protocols for equine sperm recovery. *Theriogenology*, 145, 88-94. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.015

Santos, M., Rivera, P., & Martínez, V. (2020). Impact of seminal plasma removal techniques on equine sperm quality. *Theriogenology Research*, 9(1), 35-42. https://doi.org/10.1016/j.therires.2020.01.004

Serrano Chagüeza, L. (2024). *Evaluación de la calidad seminal en equinos de raza criollo colombiano con tres diluyentes comerciales*. [Universidad Antonio Nariño]. Disponible en: http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/9337.

Smith, J. A., Cooper, T. G., & Johnson, L. (2021). Advances in sperm DNA integrity testing and clinical implications. Reproduction, 162(4), R157-R170. https://doi.org/10.1530/REP-21-0205

Smith et al. (2025). *Cryopreservation of Horse Sperm*. *PubMed* – Protocolo general de criopreservación, incluyendo centrifugación previa. Recuperado de: PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904

Torres, F., Hernández, A., & López, M. (2021). Susceptibilidad del esperma equino al daño oxidativo: mecanismos y estrategias antioxidantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 42(2), 98-107. https://doi.org/10.21897/rmv.2021.42.2.8

Tuaza, L. (2024). *Evaluación de tres curvas de congelación para la criopreservación de semen equino en el complejo intercultural y deportivo mushuc runa.* Riobamba. Recuperado de: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/20983

Vera, C. J. E. (2019). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Vidal, R., López, A., & Fernández, M. (2022). La importancia de la estructura de la cromatina espermática en la fertilidad equina. *Theriogenology*, 183, 25-33. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.008

ANEXOS

Anexo 1. Base de datos recolectados pre congelación.

Centrifugación pre congelación					
Motilidad (%)	Viabilidad	Concentración Espermática (x106 /mL)	Morfo anomalías (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
90	90	445	14,1	70	76,5
90	90	452	14,75	77	78,2
80	80	460	14,36	72	74
90	90	438	13,98	68	77,9
80	80	430	14,05	80	75,8
90	90	455	14,55	94	73,1
90	90	442	14,8	76	80,3
90	80	423	14	84	76
90	90	447	14,6	80	75,2
80	80	463	13,9	75	78
90	90	435	14,2	73,50	79,1
80	80	466	15	81	72,9
90	90	444	14,3	80	77,3
80	80	428	13,95	77,5	74,5
90	90	455	14,61	75	76,9

Sperm Filter Pre congelación					
Motilidad (%)	Viabilidad	Concentración Espermática (x106 /mL)	Morfo anomalías (%)	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
90	90	424	5,5	82	98,9
90	90	430	5,65	84	99,3
80	80	442	5,4	87	99,1
90	90	409	5,55	77	97,6
90	90	418	5,23	82,2	99,8
90	90	434	5,68	79,2	96,4
80	90	438	5,45	72,72	100
80	80	425	5,36	81,8	99,2
90	90	404	5,6	83	100
80	70	439	5,33	82	99,9
90	90	413	5,77	80,7	100
90	90	432	5,52	77,26	94,8
90	80	426	5,5	80	100
90	90	441	5,7	79,7	97,4
90	90	415	5,27	86	100

Anexo 2. Base de datos recolectados post congelación.

Centrifugado post congelación			
Motilidad %	Viabilidad	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
60	50	60	80,8
70	60	56,25	53,7
60	60	40	80,8
70	40	46	64,3
70	60	36	80,8
60	40	55,55	53,7
60	40	60	80,8
70	60	38,09	64,3
60	40	42,85	80,8
60	50	50	53,7
60	40	34	80,8
50	40	42,85	64,3
60	60	47,05	53,7
70	50	36,36	80,8
70	50	27,27	64,3

Sperm Filter post congelación			
Motilidad %	Viabilidad	Integridad de membrana plasmática (%)	Integridad de la cromatina (%)
70	50	66	59,40
70	60	53,84	64,3
60	50	58,33	80,4
60	50	44,44	59,4
50	50	50	59,40
70	60	62	64,3
70	60	56,25	80,4
60	60	57,4	69,4
60	40	54,54	59,40
50	40	58,33	64,3
70	50	53,33	80,4
60	50	62,5	79,4
70	60	53,84	59,40
70	50	50	64,3
60	40	62,5	80,4

Anexo 3. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes en variables pre congelación.

Variable	Centrifugado	Filtrado	P(2 colas)	Significancia
Motilidad (%)	n = 15 Media = 86,67 DE = 4,58 Mediana = 90,00	n = 15 Media = 87,33 DE = 4,98 Mediana = 90,00	0,6953	NS
Viabilidad (%)	n = 15 Media = 86,00 DE = 6,07 Mediana = 90,00	n = 15 Media = 86,67 DE = 6,17 Mediana = 90,00	0,5453	NS

Anexo 4: Prueba de t-studen para muestras independientes en variables pre congelación.

Variable	Centrifugado	Filtrado	Diferencia de medias	IC 95% (LI - LS)	p-valor	Significancia
Concentración espermática ($\times 10^6$/mL)	n = 15 Media = 445,53	n = 15 Media = 426,00	19,53	10,12 – 28,95	0,0002	**
Morfoanomalías espermáticas (%)	n = 15 Media = 14,34	n = 15 Media = 5,50	8,84	8,63 – 9,05	< 0,0001	**
Integridad de membrana plasmática (%)	n = 15 Media = 77,53	n = 15 Media = 80,97	-3,44	-7,31 – 0,43	0,0792	NS
Integridad de la cromatina (%)	n = 15 Media = 76,38	n = 15 Media = 98,83	-22,45	-23,87 – -21,03	< 0,0001	**

Anexo 5. Prueba de Wilcoxon para muestras independientes en variables post congelación.

Variable	Centrifugado	Filtrado	p (2 colas)	Significancia
Motilidad post-congelación (%)	n = 15 Media = 63,33 DE = 6,17 Mediana = 60,00	n = 15 Media = 63,17 DE = 7,24 Mediana = 60,00	0,9831	NS
Viabilidad post-congelación (%)	n = 15 Media = 49,33 DE = 8,84 Mediana = 50,00	n = 15 Media = 51,33 DE = 7,43 Mediana = 50,00	0,5090	NS

Anexo 6. Prueba de t-studen para muestras independientes en variables pre congelación.

Variable	Centrifugación	Filtrado	Diferencia de medias	IC 95% (LI – LS)	p-valor	Significancia
Integridad de membrana plasmática (%)	n = 15 Media = 44,82	n = 15 Media = 56,22	-11,40	-17,54 – -5,27	0,0008	**
Integridad de la cromatina (%)	n = 15 Media = 69,17	n = 15 Media = 68,31	0,87	-7,09 – 8,82	0,8251	NS

Anexo 7. Reporte del contador digital de células Luna Fl para semen filtrado.



Cell Count Report 1/2

File name: LAB_REP_ANIM_ESPOCH_FCP_EFRA_ENE2025_FILT

Date: 23 Jan., 2025, 14:26

Cell count results

Total cell concentration: 6.52 x 10^3 cells/mL
Live cell concentration: 6.50 x 10^3 cells/mL
Dead cell concentration: 2.14 x 10^2 cells/mL
Viability: 99.7 %
Average cell size: 32.5 µm
Total cell number: 305
Live cell number: 304
Dead cell number: 1

Protocol

Protocol name: New Protocol1
Dilution factor: 1.00
Min. cell size: 3 µm
Max. cell size: 90 µm
Size gating: 3 - 90 µm
Green fluorescence threshold: 10
Red fluorescence threshold: 10
Green exposure: 5
Red exposure: 2
Green calibrated value: 0x35BD
Red calibrated value: 0x4000

Cell Image (Average intensity: 119)

Cell Count Report 2/2

Cell size histogram expressed by cell number

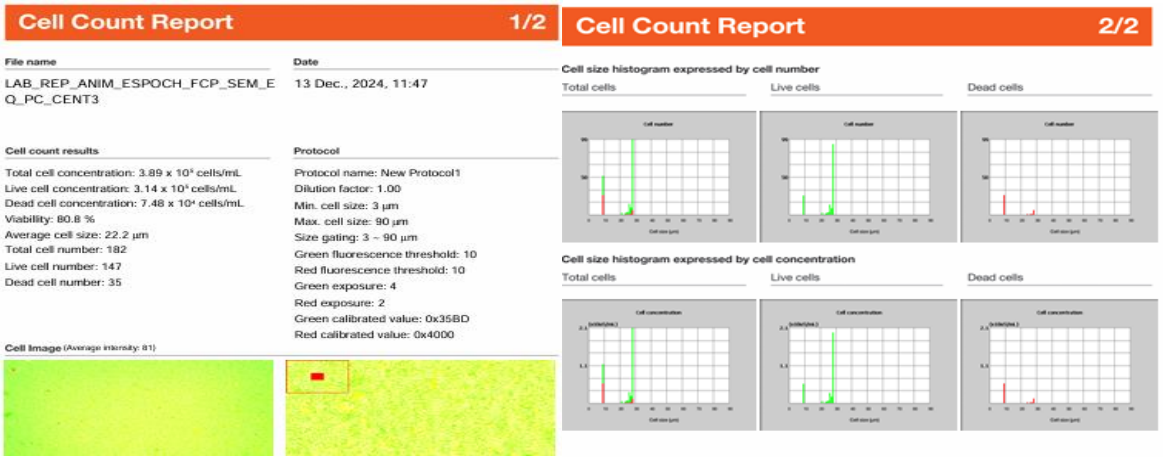
Total cells | Live cells | Dead cells

Cell size histogram expressed by cell concentration

Total cells | Live cells | Dead cells

Cell cluster graph

Anexo 8. Reporte del contador digital de células Luna Fl para semen filtrado



Cell Count Report 1/2

File name: LAB_REP_ANIM_ESPOCH_FCP_SEM_EQ_PC_CENT3

Date: 13 Dec., 2024, 11:47

Cell count results

Total cell concentration: 3.89 x 10^4 cells/mL
Live cell concentration: 3.14 x 10^4 cells/mL
Dead cell concentration: 7.48 x 10^3 cells/mL
Viability: 80.8 %
Average cell size: 22.2 µm
Total cell number: 182
Live cell number: 147
Dead cell number: 35

Protocol

Protocol name: New Protocol1
Dilution factor: 1.00
Min. cell size: 3 µm
Max. cell size: 90 µm
Size gating: 3 - 90 µm
Green fluorescence threshold: 10
Red fluorescence threshold: 10
Green exposure: 4
Red exposure: 2
Green calibrated value: 0x35BD
Red calibrated value: 0x4000

Cell Image (Average intensity: 81)

Cell Count Report 2/2

Cell size histogram expressed by cell number

Total cells | Live cells | Dead cells

Cell size histogram expressed by cell concentration

Total cells | Live cells | Dead cells

Anexo 9. Reporte del contador digital de células Luna Fl para semen fresco



Cell Count Report 1/2

File name: LAB_REP_ANIM_ESPOCH_FCP_EFRA_25_FRES

Date: 23 Jan., 2025, 13:58

Cell count results

Total cell concentration: 4.27 x 10^3 cells/mL
Live cell concentration: 4.27 x 10^3 cells/mL
Dead cell concentration: 0.00 x 10^0 cells/mL
Viability: 100.0 %
Average cell size: 18.9 µm
Total cell number: 2
Live cell number: 2
Dead cell number: 0

Protocol

Protocol name: New Protocol1
Dilution factor: 1.00
Min. cell size: 3 µm
Max. cell size: 90 µm
Size gating: 3 - 90 µm
Green fluorescence threshold: 10
Red fluorescence threshold: 10
Green exposure: 3
Red exposure: 2
Green calibrated value: 0x35BD
Red calibrated value: 0x4000

Cell Image (Average intensity: 105)

Cell Count Report 2/2

Cell size histogram expressed by cell number

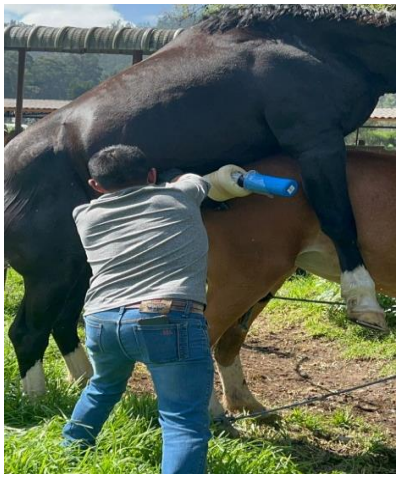
Total cells | Live cells | Dead cells

Cell size histogram expressed by cell concentration

Total cells | Live cells | Dead cells

Cell cluster graph

Anexo 10. Colecta de seminal mediante vagina artificial.



Para estimular al semental se utilizó una yegua en celo.

Anexo 11. Dilución 1:1 para proteger el eyaculado post colecta.



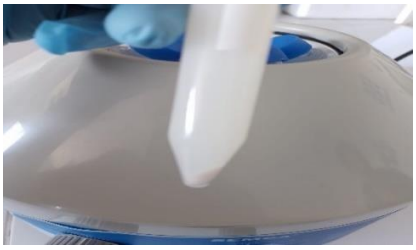
Se añadió el diluyente al semen colectado para proteger de los cambios medio ambientales.

Anexo 12. Division del eyaculado para los tratamiento



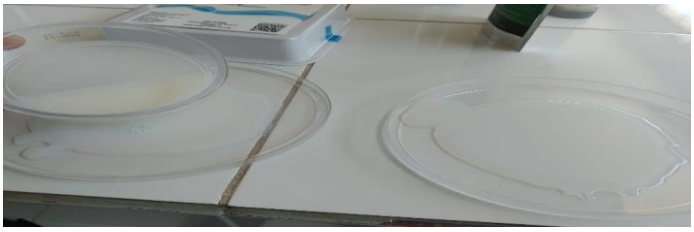
Asignación de las muestras seminales para los diferentes tratamientos.

Anexo 13. Pellet post centrifugado



Centrifugacion a 1000 rpm x 10 minutos.

Anexo 14. Uso del Sperm Filter para filtrar el eyaculado



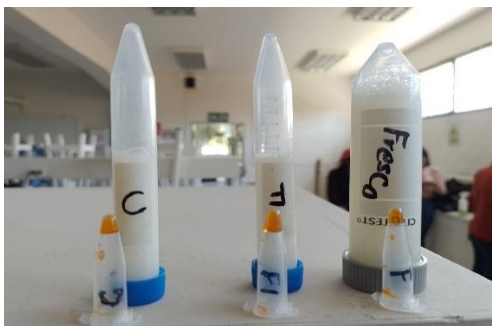
El plasma seminal atraviesa el filtro y es recogido en cajas perti.

Anexo 15. Valoracion microscopica según el tratamiento.



Muestras de cada tratamiento para evaluar mediante el uso del microscopio.

Anexo 16. Adicion de ticiones para los tratamientos en estudio.

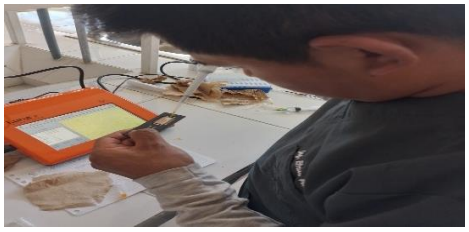


Muetras seminales teñidas con Naraja de acritina.



Muetras seminales teñidas con Botu vital.

Anexo 17. Analisis de muestras mediante LUNA fl



Adición de las muestras en la placa.



Introducción de la placa en el equipo.

Anexo 18. Preparacion de medio hiposmotico e incubacion de las muestras.



Peso de la Fructosa y Citrato de Sodio.



Incubación durante 20 minutos a 37°C.

Anexo 19. Uso de microscopio en la evaluación de las variables.



Conteo espermático con camara de newbauer.



Evaluación post congelación.

Anexo 20. Niveles de temperatura para crio preservacion.



Refrigeración a 5°C.



Pajillas en vapores de Nitrógeno.



Inversión de pajillas en nitrógeno líquido.