



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Congelación de semen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes

Juan David Montoya Páez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal
Medellín, Colombia
2016

Congelación de semen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes

Juan David Montoya Páez

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Director:

Médico Veterinario, Zootecnista, M.Sc, Ph.D. Giovanni Restrepo Betancur

Codirector:

Químico, M.Sc, Ph.D. Benjamín Alberto Rojano

Línea de Investigación:

Biotecnología de la reproducción animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biotecnología Animal - GIBA

Grupo Investigación en Química de los Productos Naturales y los Alimentos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal

Medellín, Colombia

2016

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la Dirección de Investigación y Posgrados del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Antioquia, Colombia. Agradecido con el personal de los Laboratorios en Biotecnología Animal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y del Laboratorio de Química de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. De igual forma agradecido por el apoyo y el acompañamiento permanente en este proceso de formación integral a los profesores Giovanni Restrepo Betancur y Benjamín Alberto Rojano.

Tabla de contenido

Lista de abreviaturas y unidades	6
Lista de tablas	9
Introducción	10
Objetivos	13
1. Capítulo I	14
1.1 RESUMEN.....	14
1.2 ABSTRACT.....	15
1.3 INTRODUCCIÓN.....	15
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1.5 RESULTADOS.....	20
1.6 DISCUSIÓN.....	25
1.7 CONCLUSIÓN.....	27
1.8 RECOMENDACIONES.....	27
2. Capítulo II	28.
2.1 RESUMEN.....	28
2.2 ABSTRACT.....	29
2.3 INTRODUCCIÓN.....	30

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.5 RESULTADOS.....	35
2.6 DISCUSIÓN.....	39
2.7 CONCLUSIÓN.....	42
2.8 RECOMENDACIONES.....	43
Bibliografía para la introducción.....	44
Bibliografía para el capítulo I.....	47
Bibliografía para el capítulo II.....	52

Lista de abreviaturas y unidades

ALH: Amplitud lateral de la cabeza

BCF: Frecuencia de batida de la cola

BSA: Albumina Sérica bovina

CPROT: Concentración de proteínas

DE: Desviación estándar

DMF: Dimetilformamida.

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

ESTEARICO: Ácido graso esteárico

GLC: Glicerol

HOS: Test hiposmótico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IO: Índice de oscilación

LIN: Índice de linealidad

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

MP: Movilidad progresiva

MT: Movilidad total

NCPROT: Nivel de la concentración de proteínas.

NESTEARICO: Nivel de ácido graso esteárico.

NOXP: Nivel de la oxidación proteica.

NVITE: Nivel de la concentración vitamina E

v/v: Volumen-volumen

OXP: Oxidación de proteínas

STR: Índice de rectitud

TCA: Acido tricloroacético

IM: Integridad de membranas

MFA: Morfología anormal

VAP: Velocidad media

VCL: Velocidad curvilínea

VIT: Vitalidad

VITC: Vitamina C

VITE: Vitamina E

VSL: Velocidad lineal

PBS: Buffer fosfato

HCl: Ácido clorhídrico

KOH: Hidróxido de potasio.

UNIDADES

%: Porcentaje

°C: Grados centígrados

μL: Microlitro

μm/seg.: Micrómetros por segundo

μm: Micrómetro

g: Gravedades

Hz: Hertz

M: Molar

mL: Mililitro

mM: Milimolar

nm: Nanómetros

nmol: nanomol

mL/min.: Mililitro por minuto

mm: Milímetros

mg: Miligramo

g: gramo

MOsmol: Miliosmolar

L: Litro

μ M: Micromolar

Lista de tablas

Tabla I. Parámetros de calidad seminal post-descongelación y resultados de componentes bioquímicos del plasma seminal en asnos criollos.....	21
Tabla II. Comparación de niveles de componentes bioquímicos del plasma seminal y la calidad del semen post-descongelación.....	22
Tabla III. Perfil lipídico para los plasmas seminales.....	23
Tabla IV. Coeficientes de correlación entre los parámetros de la calidad seminal post-descongelación y algunos componentes bioquímicos del plasma seminal en asnos criollos colombianos.....	24
Tabla V. Medias Generales para parámetros de calidad seminal y composición bioquímica del plasma seminal.....	36
Tabla VI. Comparación de medias de los tratamientos.....	37
Tabla VII. Regresión de la peroxidación lipídica.....	38
Tabla VIII. Comparación de medias de la relación de peroxidación lipídica en espermatozoides de asnos criollos.....	39

Introducción

El burro es único y en gran medida una especie subvalorada, cuyo antepasado, el asno africano salvaje evolucionó para sobrevivir en ambientes semiáridos, de montaña con fuentes de alimentos escasas y con acceso al agua intermitente (Burden y Thiemann, 2015). Domesticado solo hace 5000 años, ha sido y es utilizado con propósitos de desarrollo de proyectos productivos, trabajo y vivir junto con los seres humanos en todo el mundo (Rossel *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2014). Recientemente, el burro también ha encontrado un papel importante como mascota y compañero, y en algunas otras, la leche de burra y la carne son apreciadas. Aunque el burro tiene un papel importante en el desarrollo humano y la historia incluyendo contextos religiosos y relatos históricos, el burro ha sido a menudo denigrado como un animal humilde de carga y con frecuencia se veía como el "pariente pobre" de su "primo" el caballo (Burden y Thiemann, 2015).

Actualmente, el mayor interés en la crianza del burro como reproductor es para la producción de mulares (Vidament *et al.*, 2009, Madison *et al.*, 2013). Debido a que estos son productos muy deseables en el medio rural, porque reúnen las mejores características de las dos especies en un único animal (Santos, 1994, Oliveira *et al.*, 2014).

La criopreservación es una técnica que permite mantener las células a baja temperatura sin perder su viabilidad y utilidad, tiene como objetivo inhibir la actividad metabólica del semen, garantizando su vitalidad y función a través del tiempo, conservándolo indefinidamente (Cruz *et al.*, 2006). La criopreservación del semen se constituye como una herramienta importante que mejora las tecnologías reproductivas en el campo de la ciencia animal (Benson *et al.*, 2012).

Canisso *et al.* (2008) reportan que aparentemente, el primer trabajo sobre congelación de semen de burros fue realizado por Polge y Minotakis (1964), con un diluyente a base de yema de huevo y glicerol siguiendo la metodología de congelación del semen bovino. Krause y Grove (1967) evaluaron diluyentes a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, siguiendo la metodología del semen bovino en pellets, obteniendo movilidades post-descongelación del 50%, con resultados de fertilidad muy variables.

La escasa fertilidad del semen criopreservado en équidos, ha limitado su utilización, siendo esta situación atribuible a la alteración de la integridad de las macromoléculas de los espermatozoides (lípidos, ácidos nucleicos y proteínas); lo cual compromete la fisiología normal y funcionalidad de dichas células (Guasti *et al.*, 2012). Se ha descrito que uno de los factores más relacionados con la aparición de estas alteraciones, es el estrés oxidativo del semen provocado por los choques térmicos en el procesos de criopreservación (Membrillo *et al.*, 2003).

El plasma seminal es una mezcla de líquido secretado por los testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Kareskoski y Katila, 2008), que juegan un papel importante para el desarrollo y maduración de los espermatozoides en el tracto genital femenino (Lozano-Benito *et al.*, 2011). Ball (2008) reporta que la mayoría de la capacidad antioxidante del semen equino se encuentra en el plasma seminal, el cual posee actividades considerables de enzimas como la superóxido dismutasa y la glutatión-peroxidasa (Baumber y Ball, 2005). Otras moléculas presentes en el plasma seminal, como vitamina C y vitamina E podrían actuar como antioxidantes (Ball *et al.*, 2000, Baumber *et al.*, 2000), sin embargo, no se han realizado análisis detallados de los componentes del plasma seminal en asnales. Rota *et al.* (2012) plantean de igual forma que no se ha empleado la incorporación de plasma seminal en la criopreservación y no se conoce si las propiedades del plasma seminal de asnales son similares al plasma de los sementales equinos. El plasma seminal contiene sustancias que benefician a los espermatozoides en condiciones naturales, por lo cual evaluar algunos de sus componentes bioquímicos puede ser útil en el mejoramiento de los procesos de suplementación del semen sometido a criopreservación. Adicionalmente, dada la percepción que el semen de asnos posee una mayor resistencia que el semen equino, es factible considerar el uso de plasma seminal asnal para el mejoramiento de la criopreservación de células espermáticas de otros équidos.

Dentro de los procesos de criopreservación del semen existen varias metodologías, las cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de temperatura y en las concentraciones de los crioprotectores utilizados. Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de criopreservación, como son el glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol y la dimetilformamida, entre otros (Medeiros *et al.*, 2002; Morillo-Rodríguez, 2013, Nouri *et al.*, 2013). De igual forma se han adicionado sustancias de origen animal como la yema de huevo, que contiene esencialmente colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad, que previenen la formación de cristales de hielo, protegiendo al espermatozoide contra las

alteraciones térmicas durante los procesos de criopreservación y descongelación (Nouri *et al.*, 2013).

El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2013) de Colombia, través de “SIEMBRA” del Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología Agroindustrial y la cadena productiva equina, asnal y mular, promueve el estudio y mejoramiento de las técnicas de criopreservación de material genético de asnos criollos colombianos y la elaboración de un banco de germoplasma que permita la preservación de esta raza nativa y diversificar así las líneas familiares existentes. De manera que la comunidad agropecuaria nacional pueda acceder a especímenes mulares valiosos para diversas modalidades de trabajo, servicio y entretenimiento, a través de la optimización de su reproducción mediante biotecnologías como la inseminación artificial con semen criopreservado. Igualmente, como paso fundamental para la transferencia de tecnología hacia los productores, así como para el incremento de la eficiencia productiva y el fomento del desarrollo económico regional y nacional.

Objetivos

General

Evaluar protocolos de congelación de semen de asnos criollos colombianos con base a diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes.

Específicos

1. Identificar algunos componentes bioquímicos (concentración de proteínas, perfil lipídico, vitamina C y E) del plasma seminal de asnos criollos colombianos.
2. Evaluar la asociación entre los componentes bioquímicos del plasma seminal, sobre parámetros de calidad del semen fresco y post-descongelación de asnos criollos colombianos.
3. Evaluar diferentes niveles de suplementación con base a crioprotectores, yema de huevo y plasma seminal, y su efecto sobre la calidad post-descongelación de semen de asnos criollos colombianos.

1. Capítulo I.

EVALUACIÓN DE COMPONENTES BIOQUÍMICOS DEL PLASMA SEMINAL Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD DEL SEMEN DE ASNOS CRIOLLOS COLOMBIANOS.

1.1 RESUMEN:

Objetivo. Identificar algunos componentes bioquímicos del plasma seminal y la relación con parámetros de la calidad del semen fresco y descongelado en asnos criollos colombianos. **Materiales y métodos.** El semen de cinco asnos criollos colombianos (dos eyaculados por animal), fue evaluado y criopreservado, empleando diluyentes con base a leche semidescremada, yema de huevo y plasma seminal. En semen fresco y post-descongelación, se realizó la evaluación de los parámetros de la calidad seminal e identificación de algunos componentes bioquímicos del plasma seminal. Para el análisis estadístico se ajustaron modelos mixtos y se realizaron análisis de correlación. Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias. **Resultados.** Se hallaron correlaciones negativas del contenido de VITC con los parámetros de MT ($r = -0.703$) y MP ($r = -0.833$) en semen fresco. Para la MT del semen post-descongelado se encontraron correlaciones de $r = -0.264$, $r = -0.161$ y $r = -0.134$, con los parámetros de CPROT, OXP y VITC, respectivamente. Así mismo, niveles altos de VITC, OXP, CPROT y ESTEARICO, afectaron negativamente la calidad seminal post-descongelación. **Conclusiones.** La composición del plasma seminal de asnos criollos colombianos, es determinante en la calidad del semen fresco y post-descongelado.

PALABRAS CLAVE: Criopreservación, proteínas, vitaminas, lípidos

1.2 ABSTRACT

Objective. To identify some seminal plasma biochemical components and their relation with fresh and thawed semen quality parameters in Colombian Creole donkeys. **Materials and methods.** Semen from five Colombian Creole donkeys (two ejaculates per animal) was evaluated and cryopreserved, using extenders based on reduced fat milk, egg yolk and seminal plasma. In fresh and post-thawed semen, evaluation of sperm quality parameters and identification of certain biochemical components of seminal plasma, were performed. For statistical analysis, mixed models were adjusted and correlation analysis were performed. Tukey's test was used to compare means. **Results.** Negative correlations of VITC content with MT ($r = -0.703$) and MP ($r = -0.833$) parameters, in fresh semen were found. For post-thawed semen MT, correlations of $r = -0.264$, $r = -0.161$ and $r = -0.134$ with CPROT, VITC and OXP parameters, were found respectively. Also, high levels of VITC, OXP, CPROT and ESTEARICO, negatively affect post-thawed semen quality. **Conclusions.** Composition of Colombian Creole donkeys seminal plasma, is determinant in fresh and post-thawed semen quality

KEY WORDS: Cryopreservation, proteins, vitamins, lipids

1.3 INTRODUCCIÓN:

La población de burros ha incrementado ampliamente a lo largo de las últimas décadas en América del Sur, este interés es principalmente para la producción de mulares para el uso en el deporte, el ocio y sobre todo en el manejo de los rebaños de ganado vacuno (Oliveira *et al.*, 2014). La inseminación artificial con semen congelado es considerada una de las biotecnologías de la reproducción más importantes para incrementar el número de individuos de muchas especies, como también para mejorar la distribución genética y reducir la consanguinidad (Ortiz *et al.*, 2014). La criopreservación del semen requiere de muchos pasos, entre ellos la centrifugación del eyaculado (Contri *et al.*, 2012), ésta con el fin de retirar el plasma seminal, considerado como perjudicial para los espermatozoides durante el almacenamiento a bajas temperaturas (Carver *et al.*, 2002). En los équidos esta condición no deseada, es reducida con la dilución del semen o con la eliminación parcial o total del plasma seminal (Miró *et al.*, 2009). Sin embargo, el plasma seminal en condiciones naturales, está involucrado en varios eventos que preceden la fertilización de los espermatozoides (Kareskoski y Katila, 2008), tal como la activación de la movilidad, la acción antimicrobiana, la neutralización de metabolitos y un efecto mediador de la capacitación espermática y de la respuesta inflamatoria uterina postcoital (Rodríguez-Martínez 2011). En una investigación con burros de la raza Zamorano-Leonés se encontró que el semen que fue centrifugado obtuvo mejores resultados de movilidad total, movilidad progresiva e integridad de la membrana plasmática con respecto al semen que no fue centrifugado (Serres *et al.*, 2002). Algunos estudios han demostrado que las proteínas unidas a la membrana de los espermatozoides, son similares a las existentes en el plasma seminal, de igual forma, pruebas de fertilidad realizadas en el semen recolectado de la cola del epidídimo, han puesto en duda la necesidad de los componentes del plasma seminal, debido a que se ha observado que las células espermáticas son capaces de fertilizar un ovocito, sin contacto previo con las secreciones de las glándulas accesorias (Monteiro *et al.*, 2011, Papa *et al.*, 2008). Igualmente, el papel fisiológico del plasma seminal no se entiende completamente todavía (Kareskoski y Katila, 2008), pero por otra parte se ha descrito que la mayoría de la capacidad antioxidante del semen equino se encuentra en dicho plasma (Ball, 2008). Investigaciones actuales con plasma seminal se han enfocado en identificar las enzimas antioxidantes allí presentes y en la relación de éstas con la calidad seminal (Bucci *et al.*, 2015; Härtlova *et al.*, 2013). Acorde con lo anterior, el objetivo

planteado para esta investigación, es identificar algunos componentes bioquímicos del plasma seminal y su relación con parámetros de calidad del semen fresco y post-descongelado en asnos criollos colombianos (objetivos específicos 1 y 2).

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Localización. El material de investigación (semen de asnos) se recolectó en cinco predios dedicados a la cría de asnos de la raza criollo colombiano, localizados en los municipios de Caldas, La Estrella, Copacabana y Girardota del Valle del Aburrá, Antioquia (Colombia). Las muestras fueron procesadas y evaluadas en el laboratorio de Biotecnología animal del Centro de experimentación y laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid sede Bello, y en el laboratorio de Química de los alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

1.4.2 Recolección y evaluación del material de investigación. Cinco ejemplares asnales (*Equus asinus*) de la raza Criollo colombiano, se utilizaron para la recolección de dos eyaculados (fracción espermática) por animal, con un periodo de descanso sexual máximo de una semana, para un total de 10 eyaculados sobre los cuales se evaluaron los tratamientos. Los ejemplares se encontraban entre los 4 y 8 años de edad, todos en un régimen de mínimo una colecta semanal, con fertilidad comprobada con crías nacidas vivas y con una condición corporal de 7 a 8, en una escala entre 1 y 9, siendo 3 o menos considerado como extremadamente delgado y entre 8 y 9 como obeso (Warren, 2009).

La recolección del semen se realizó mediante el método de la vagina artificial, empleando una vagina modelo Missouri (Minitube), lubricada con gel no espermicida y sobre una yegua o burra, con la finalidad de aumentar la estimulación sexual del macho. La fracción en gel del eyaculado fue removida por filtración. El semen recién recolectado se diluyó en proporción 1:1 en un diluyente a base de leche semidescremadas, caseinatos, azúcares y antibióticos conocido comercialmente como Equipo[®] (Minitube) a 37°C, y otra fracción fue destinada a la extracción del plasma seminal mediante centrifugación a 850 g durante 15 minutos, el material biológico se transportó hacia el laboratorio en un equipo especializado de refrigeración (Equitainer[®], Minitube).

A cada eyaculado recolectado se le realizaron evaluaciones movilidad, vitalidad, morfología e integridad de la membrana plasmática, mediante los métodos descritos posteriormente. Como criterio de selección, solo fueron procesados los eyaculados con parámetros mínimos de 60% de movilidad progresiva y 100 millones de espermatozoides por mL (Pérez-Osorio *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2002).

1.4.3 Evaluación de la calidad seminal

1.4.3.1 Evaluación de la movilidad. La movilidad espermática se evaluó mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA). Para esto se utilizó un procedimiento modificado del reportado por Hidalgo *et al.* (2005), empleando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon, Inc) con una cámara digital Scout SCA780 (Basler), adaptada a un computador dotado del software Sperm class analyzer (SCA[®]), motility and concentration (Microptic S.L.). Fueron analizados los parámetros: movilidad total, movilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), linealidad (LIN), rectitud (STR), índice de oscilación (IO), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida (BCF).

1.4.4.2 Evaluación de la vitalidad y morfología. La vitalidad (VIT) y la morfología (MA) se evaluó mediante el conteo de 200 espermatozoides teñidos por la técnica de eosina-nigrosina modificada por Barth y Oko (1989) y Brito *et al.* (2011), sobre un portaobjetos temperado a 37°C en una platina térmica, se depositó una gota de semen y a su lado una gota de colorante eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich 861006 y N4763) a 37°C. Ambas gotas se mezclaron durante 30 a 60 segundos, se realizó un extendido y la fijación del mismo con calor sobre una platina térmica. Los espermatozoides teñidos con la tinción supravital fueron clasificados como muertos, mientras aquellos que no incorporaron el colorante fueron clasificados como vivos. Los cuales fueron clasificados como anormales aquellos espermatozoides con anomalías primarias o secundarias. Finalmente se establecieron porcentajes generales de espermatozoides morfológicamente normales y espermatozoides vivos (Graham y Mocé, 2005).

1.4.3.3 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (HOS). Se evaluó la integridad de la membrana plasmática (IM) de los espermatozoides por una metodología

modificada de la prueba hipoosmótica (HOS) reportada por Neild *et al.* (1999). Se tomaron 100 µl de semen y se adicionaron a un tubo con 500 µl de una solución hipoosmótica de sacarosa 5.4% (100 mOsmol/L). Esta mezcla se incubó a 38.5°C por 30 minutos y luego se evaluó la reacción (turgencia) de 200 células en mínimo 5 campos diferentes (400X), utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc.).

1.4.4 Variables evaluadas en el plasma seminal

1.4.4.1 Concentración de proteínas. La cuantificación de proteínas del plasma seminal se realizó mediante el método de Bradford, el cual está basado en el cambio de color de Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La unión del colorante con las proteínas fue evaluada por espectrofotometría (Multiskan™, Thermo scientific) a 595nm, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se preparó una solución de albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/mL y se realizaron diluciones para la construcción de una curva patrón (Bradford, 1976).

1.4.4.2 Medición de la oxidación proteica. La acumulación de proteínas oxidadas en el plasma seminal, fue evaluada por el contenido de grupos carbonilo, que puede cuantificarse espectrofotométricamente a través de la reacción con DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) a 360nm (Akagawa *et al.*, 2009) Las muestras se sometieron a centrifugación, el sedimento se solubilizó en 1mL de ácido tricloroacético (TCA) y se centrifugaron nuevamente (1500 x g, 10 minutos). Los sedimentos se incubaron con 1mL de 10mM DNPH (recién preparado en 2M HCl, en la oscuridad) durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación cada 10 minutos. Después de esta incubación, se añadió 1mL de TCA al 20% y las muestras se centrifugaron a 20.000 x g durante 3 minutos. El sobrenadante fue decantado y el sedimento se mezcló con 1mL de una solución 1:1 de etano-etil-acetato. Posteriormente el sedimento se incubó con 1mL de guanidina 6M (preparada en PBS, pH 6,5) durante 15 minutos a 37°C y se centrifugó a 1500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y la oxidación de proteínas se estimó espectrofotométricamente ((Multiskan™, Thermo scientific) a 360nm.

1.4.4.3 Determinación de Vitamina C. Para la medición de las vitaminas previamente se realizaron la liofilización de los plasmas seminales (FreeZone 2.5 liter, Labconco). El contenido de Vitamina C (ácido ascórbico) para las muestra, se determinó mediante análisis

por HPLC, según el protocolo modificado de Novakova *et al.* (2008). Las muestras de plasma fueron diluidas en agua supra-pura en caso de ser necesario, antes de la inyección al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo líquido (Shimadzu, LC-20AD), equipado con un auto inyector (SIL-20A /HT), un módulo de comunicación (CBM-20A) y un detector de fila de diodos a 245nm. La cuantificación de ácido ascórbico se llevó a cabo en una columna C-8 de dimensiones (5 μ m) 250*4.6. Como fase móvil se utilizó Ácido Fórmico 0,1%. La razón de flujo de la fase móvil fue 0.8mL/min, 35°C y condiciones isocráticas. Para la identificación y cuantificación del compuesto se construyeron previamente curvas de calibración con ácido ascórbico grado HPLC como patrón.

1.4.4.4 Determinación de Vitamina E. Para la medición de las vitaminas previamente se realizaron la liofilización de los plasmas seminales (FreeZone 2.5 liter, Labconco). El contenido de Vitamina E (α - Tocoferol) para las muestra, se determinó mediante análisis por HPLC, según el protocolo modificado de Wagner *et al.* (2001). Las muestras de plasma fueron diluidas en agua supra-pura en caso de ser necesario, antes de la inyección al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo líquido (Shimadzu, LC-20AD), equipado con un auto inyector (SIL-20A /HT), un módulo de comunicación (CBM-20A) y un detector de fila de diodos a 295nm. La cuantificación de Vitamina E se llevó a cabo en una columna LiChrospher RP-18 de dimensiones (5 μ m) 250 * 4.5. Como fase móvil se utilizó Metanol/Diclorometano (85:15, % v/v). La razón de flujo de la fase móvil fue 0.8mL/min, 35°C y condiciones isocráticas. Para la identificación y cuantificación del compuesto se construyeron previamente curvas de calibración con α - Tocoferol grado HPLC como patrón

1.4.4.5 Perfil lipídico. El perfil de ácidos grasos de la fracción apolar extraída previamente de plasmas seminales se realizó en un cromatógrafo de gases (6890N Agilent) acoplado a un detector selectivo de espectrofotometría de masas (MS 5973N Agilent) y equipado con un inyector split/splitless. La temperatura del inyector fue 300°C y la muestra previamente derivatizada con KOH-Metanol fue inyectada automáticamente en el modo Split-less. Se usó una columna HP-5 ms (5 % fenil metil siloxano) de 30m, 0.25mm con un espesor de película 0.25 μ m y una temperatura máxima de 325°C. El programa de temperatura se inició a 50°C subiendo a 200°C (5 minutos) y alcanzando una temperatura final de 300°C (14 minutos) a una rata de 10 °C/min. Se usó helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del detector fue de 300°C. El software usado para el cálculo de todos los parámetros fue MSD ChemStation D 02.00.275 Copyright© Agilent Technologies

1989-2005. Para la determinación de ácidos grasos saturados e insaturados como metil-ésteres se usó la base de datos NIST 2005 (Zapata-Luján *et al.*, 2013).

1.4.5 Criopreservación del semen de asnales. La criopreservación del semen se realizó mediante un protocolo modificado de congelación (Medeiros *et al.*, 2002; Bustamante *et al.*, 2009). El semen diluido fue centrifugado por 12 minutos a 850 x g y del sobrenadante (diluyente y plasma seminal) fue descartado. El precipitado fue resuspendido en diluyente Equipro® y suplementado con distintos componentes y diferentes niveles definiendo los tratamientos que se encuentran descritos más adelante en el capítulo II. Posteriormente, el semen diluido fue mantenido en refrigeración a 5°C por 60 minutos y luego se empacó en pajillas de 0.5mL, mediante un equipo automático de empaque y sellado de pajillas por ultrasonido (MRS1 Dual V2, IMV Technologies). Las pajillas luego fueron sometidas a vapores de nitrógeno líquido por 15 minutos, para finalmente ser almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido (IMV Technologies).

1.4.6 Diseño estadístico. Se realizó un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados mediante el ajuste de modelos mixtos para cada variable dependiente de calidad seminal y componentes del plasma seminal. En cada modelo se incluyeron los efectos fijos de: asno, eyaculado y experimento. A partir del análisis descriptivo de distribución de los datos, se definieron niveles (bajo, medio y alto) para cada uno de los componentes del plasma seminal. Para asegurar la normalidad de los datos se utilizó prueba de Shapiro Wilk y se realizaron transformaciones logarítmicas. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las variables de calidad seminal y los componentes del plasma seminal. Las comparaciones de medias entre asnos y niveles de componentes, se realizaron mediante la prueba de Tukey. Todas las evaluaciones se realizaron con el programa SAS 9.2.

1.5 RESULTADOS

Un total de 10 muestras de semen fresco de asnales (2 eyaculados por animal) fueron evaluadas y procesadas. El promedio para los parámetros espermáticos del semen fresco fue: movilidad total $92.24 \pm 7.14\%$, movilidad progresiva $68.25 \pm 12.08\%$, VCL $117.85 \pm 19.53 \mu\text{m}/\text{seg}$, VSL $49.89 \pm 8.78\mu\text{m}/\text{seg}$, VAP $84.46 \pm 17.66 \mu\text{m}/\text{seg}$., VIT $88.20 \pm 6.47\%$ e integridad de membrana $63.9 \pm 6.0\%$

Para el semen criopreservado los promedios de los parámetros post-descongelación por animal y los resultados de los componentes del plasma seminal de cada asno se encuentran descritos en la Tabla I.

Tabla I. Parámetros de calidad seminal post-descongelación y resultados de componentes bioquímicos del plasma seminal en asnos criollos colombianos (Media \pm DE).

	ASNOS				
CALIDAD SEMINAL	ASNO 1	ASNO 2	ASNO 3	ASNO 4	ASNO 5
MT (%)	34.81 \pm 20.80a	31.49 \pm 22.57ab	52.83 \pm 21.16c	26.2 \pm 17.98bd	17.5 \pm 12.13d
MP (%)	21.79 \pm 15.54a	19.71 \pm 15.58a	38.26 \pm 19.20b	14.22 \pm 9.67c	11.97 \pm 11.17c
VIT (%)	32.83 \pm 6.24a	29.03 \pm 10.42a	46.75 \pm 10.48b	31.20 \pm 12.62 ^a	22.13 \pm 4.76 ^a
MA (%)	14.21 \pm 3.02	23.82 \pm 3.60b	13.69 \pm 2.91a	12.83 \pm 5.01a	10.48 \pm 3.52c
IM (%)	23.36 \pm 12.08 ^a	26.42 \pm 10.64b	39.66 \pm 10.93a	23.69 \pm 7.39a	15.75 \pm 3.20c
COMPONENTES DEL PLASMA SEMINAL					
CPROT (mg/ml PS)	15.31 \pm 0.56a	15.54 \pm 0.03b	14.62 \pm 1.24c	16.85 \pm 0.16d	14.79 \pm 0.83e
OXP (nmol/g proteína)	0.0243 \pm 0.003a	0.00675 \pm 0.01b	0.0113 \pm 0.0014c	0.023 \pm 0.002d	0.0113 \pm 0.001e
VITE (mg/L PS)	38.1 \pm 6.42a	175.47 \pm 39.51b	124.77 \pm 15.13c	345.40 \pm 101.75d	136.06 \pm 89.39e
VITC (mg/L PS)	133.43 \pm 0.00a	202.72 \pm 60b	266.97 \pm 7.01c	253.75 \pm 60.62d	282.12 \pm 41.80e
ESTEARICO (%)	32.49 \pm 13.13a	30.87 \pm 4.39b	0	17.77 \pm 3,24c	31.81 \pm 8.00d

Promedios con letras diferentes denotan diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los animales. CPROT: mg de BSA equivalente/mL de plasma seminal, OXP: nmol/g proteína BSA)

VITE: mg/L de plasma seminal, VITC: mg/L de plasma seminal

Tabla II. Perfil lipídico para los plasmas seminales.

<i>ASNO</i>	<i>EYACULADO</i>	<i>PALMITICO</i>	<i>ESTEARICO</i>	<i>OLEICO</i>	<i>LINOLEICO</i>	<i>PANTEDACANOICO</i>	<i>TRIDECANOICO</i>
1	1	15.16	19.46	49.29	16.09	---	---
1	2	---	45.52	---	---	57.48	---
2	1	---	26.51	---	---	---	73.49
2	2	---	35.22	---	---	64.78	---
3	1	---	---	---	---	---	---
3	2	---	---	---	---	---	---
4	1	---	14.56	39.98	12.01	---	33.44
4	2	79.08	20.98	---	---	---	---
5	1	60.71	39.29	---	---	---	---
5	2	---	24.33	---	9.29	66.38	---

Los resultado para todos los ácidos son expresados en porcentaje composicional (%)

Para la comparación de la relación de los componentes bioquímicos del plasma seminal y los parámetros de calidad del semen de asnos criollos post-descongelación, se definieron niveles de dichos componentes (bajo, medio, alto). Para el perfil lipídico solo se incluyó el análisis por niveles del ácido esteárico, toda vez que fue el único ácido graso con una presencia consistente en la mayoría de los asnos evaluados. Los resultados se presentan en la tabla II.

Tabla III. Comparación de niveles de componentes bioquímicos del plasma seminal y la calidad del semen post-descongelación.

	<i>MT</i>	<i>MP</i>	<i>VCL</i>	<i>VSL</i>	<i>VAP</i>	<i>VIT</i>	<i>MA</i>	<i>IM</i>
	(%)	(%)	($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	(%)	(%)	(%)
NCPROT								
<i>BAJO</i>	38.496a	26.798a	94.513a	65.679a	82.375a	37.453a	15.131a	27.421a
<i>MEDIO</i>	33.829b	21.234b	81.078b	67.897a	69.868b	32.219b	15.982a	27.562a
<i>ALTO</i>	26.202c	14.222c	80.485c	45.555b	67.879b	31.203b	12.843b	23.687b
NOXP								
<i>BAJO</i>	40.179a	27.887a	95.003a	69.170a	83.183a	37.806a	15.343a	31.394a
<i>MEDIO</i>	29.565b	16.525b	76.515b	53.146b	64.382b	33.203b	-	22.516b
<i>ALTO</i>	27.228b	15.723b	78.429b	56.279b	66.683b	28.552c	14.250b	21.771b
NVITC								
<i>BAJO</i>	34.814a	24.984a	83.162a	64.223a	72.732a	32.828a	17.350b	23.359a
<i>MEDIO</i>	37.487a	21.797a	86.111b	61.889a	74.021a	35.113a	11.643c	29.681b
<i>ALTO</i>	28.214b	17.317b	88.819b	60.906a	72.732a	33.292a	15.354a	24.062a
NVITE								
<i>BAJO</i>	30.433a	19.341a	88.262a	65.762a	77.165a	31.288a	17.434b	24.350a
<i>MEDIO</i>	46.648b	32.954b	93.618b	66.953a	81.706a	41.76b	10.601c	34.771b
<i>ALTO</i>	24.798c	12.445c	70.284c	45.656b	56.892b	29.688a	12.841a	20.625c
NESTEARICO								
<i>BAJO</i>	38.604a	26.083a	90.609a	65.679a	78.801a	38a	12.840a	29.698a
<i>MEDIO</i>	31.494b	19.706b	92.586a	67.897a	80.88a	29.301b	23.782b	26.422b
<i>ALTO</i>	23.547c	12.273c	67.255b	45.555b	55.082b	27.516b	12.754a	18.141c

Promedios con letras diferentes denotan diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los niveles alto, medio y bajo para los parámetros de la calidad seminal post-descongelación.

Para el semen fresco solo se encontraron coeficientes de correlación significativos ($P \leq 0.05$), para el contenido de vitamina C respecto a MT y MP, con valores de $r = -0.703$ ($P \leq 0.05$) y

r= -0.833 (P≤ 0.05), respectivamente. En la tabla IV se presentan los coeficientes de correlación para los parámetros de la calidad seminal post-descongelación respecto a los componentes bioquímicos del plasma seminal en asnos criollos colombianos.

Tabla IV. Coeficientes de correlación entre los parámetros de la calidad seminal post-descongelación y algunos componentes bioquímicos del plasma seminal en asnos criollos colombianos.

	CROT (mg/ml PS)	OXP (nmol/g proteína)	VITC (mg/L PS)	VITE (mg/L PS)	ESTEARICO (%)
MT (%)	-0.264	-0.161	-0.134	0.082	-0.073
	<.0001	0.003	0.01	0.164	0.24
MP (%)	-0.354	-0.225	-0.125	0.086	-0.113
	<.0001	<.0001	0.02	0.144	0.06
VCL (µm/seg.)	-0.308	-0.417	0.119	-0.054	-0.263
	<.0001	<.0001	0.032	0.352	<.0001
VSL (µm/seg.)	-0.263	-0.371	0.115	-0.146	-0.269
	<.0001	<.0001	0.039	0.0127	<.0001
VAP (µm/seg.)	-0.302	-0.402	0.101	-0.093	-0.267
	<.0001	<.0001	0.06	0.115	<.0001
VIT (%)	-0.289	-0.199	-0.066	0.152	-0.094
	<.0001	0.0003	0.237	0.009	0.132
MA (%)	0.159	-0.214	0.0711	-0.331	0.091
	0.0042	0.0001	0.204	<.0001	0.147
IM (%)	-0.192	-0.201	-0.043	0.065	-0.203
	0.0006	0.0003	0.43	0.271	0.001

Para cada variable se presenta arriba: coeficiente de correlación (r) y abajo: valor de PCROT: mg de BSA equivalente/mL de plasma seminal, OXP: nmol/g proteína BSA) VITE: mg/L de plasma seminal, VITC: mg/L de plasma seminal

1.6 DISCUSIÓN

El plasma seminal es una mezcla de líquido secretado por los testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Kareskoski y Katila, 2008), que juegan un papel importante sobre la fisiología, debido a que alteran las funciones de los espermatozoides en el macho y la hembra, el plasma seminal tiene funciones metabólicas en el proceso de fertilización, debido a que es un mediador de la capacitación espermática y de la respuesta inflamatoria post-coital en el útero (Boe-Hansen *et al.*, 2015). La presencia del plasma seminal se cree que es esencial para el proceso de fecundación (Ramires-Neto 2013a), sin embargo en otras publicaciones reportan que espermatozoides colectados del epidídimo que son procesados en diluyentes, tienen la calidad y la fertilidad igual o superior a los espermatozoides mezclados con plasma seminal en el eyaculado (Monteiro *et al.*, 2011; Papa *et al.*, 2008). De otro lado, para los ejemplares asnales es limitado el conocimiento que se tiene respecto a la composición del plasma seminal, así como de las implicaciones que éste fluido biológico podría tener sobre la calidad seminal.

Los resultados de composición del plasma seminal muestran una amplia variabilidad para la concentración de las vitaminas C y E, entre los asnos evaluados (Tabla I). Algo similar sucedió para el perfil lipídico del plasma seminal, en el cual no se observó homogeneidad en los ácidos grasos presentes entre asnos y eyaculados. Incluso en las muestras correspondientes a uno de los asnos evaluados, no se detectó la presencia de ácidos grasos (Tabla II). En este estudio se encontraron diferencias en la composición del plasma seminal entre los animales evaluados (Tabla I). Resultados presentados por Morrel *et al.* (2014), exponen que existe una variación considerable entre los sementales con respecto al contenido de plasma seminal, como también la interacción del mismo con los espermatozoides. Estudios realizados por Ramires-Neto *et al.* (2013b) reportan que la presencia del plasma seminal tiene efectos deletéreos sobre la calidad y la vitalidad de los espermatozoides cuando son sometidos a algún proceso de cambio en la temperatura. Como excepción, en esta investigación el contenido de proteínas (CPROT) fue bastante similar incluso entre los asnos. Además de que no se conocen investigaciones donde se reporte la medición de estos componentes, en el plasma seminal de asnos.

Un nivel alto de proteínas en el plasma seminal, coincidió con valores inferiores para diferentes parámetros de calidad del semen criopreservado (Tabla IV). Es probable que

fenómenos como la oxidación proteica descrita en el semen equino (Morte *et al.*, 2008), esté relacionada con dicho efecto. Acorde con lo anterior, se hallaron coeficientes de correlación negativos con la mayoría de parámetros de calidad evaluados, así como una correlación positiva con la morfología anormal (Tabla V).

Son pocos los trabajos realizados en oxidación de proteínas para el semen o el plasma seminal en équidos, en una investigación de Morte *et al.* (2008), se evaluó la oxidación de las proteínas y los lípidos en el plasma seminal, obtenido de eyaculados en dos temporadas distintas de apareamiento, sin embargo los autores no reportaron una interacción entre la oxidación proteica y las funciones del espermatozoide. Para el presente estudio, se evidenció que a mayor nivel de oxidación de proteínas, se afectan los parámetros de calidad seminal (Tabla III), adicionalmente es factible inferir que la oxidación proteica está relacionada con la concentración de proteínas totales presentes en el plasma seminal. De igual forma, los resultados presentados en esta investigación muestran que un nivel alto en la concentración de proteínas, tiene un efecto perjudicial sobre la MT, MP, VCL, VSL, VIT y la integridad de membrana, mientras que a niveles medio y alto de la oxidación proteica se alteró la VAP (Tabla III). Sin embargo otros autores no hallaron efecto del contenido de proteínas totales sobre la calidad seminal en caballos fértiles y subfértiles (Guasti *et al.*, 2014).

En el plasma seminal equino se reportan valores de vitamina C equivalentes a 1.76 mg/L, 1.08 mg/L, 2.05 mg/L y 0.84 mg/L, para el otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente (Waheed *et al.*, 2013.). Mientras otros investigadores encontraron una concentración total de vitamina C de 6.0 mg/L en equinos ubicados en el trópico (Restrepo *et al.*, 2014.). Estos resultados son ampliamente inferiores a los encontrados en esta investigación (Tabla I), lo cual indicaría una marcada influencia de la especie en la concentración de vitamina C del plasma seminal de los équidos. Respecto al contenido de proteínas del plasma seminal, se reportan resultados de proteínas totales por eyaculado en caballos fértiles y subfértiles, de 740.8 ± 489.6 mg y 416.4 ± 254.7 mg, respectivamente (Guasti *et al.*, 2014). Así mismo, la vitamina C podría tener efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5°C (Aurich *et al.*, 1997), pero por otra parte, no mejora significativamente el mantenimiento de la movilidad (Membrillo- Ortega *et al.*, 2003) y no participa con un rol antioxidante para reducir la peroxidación de los lípidos (Vasconcelos *et al.*, 2013). En esta investigación, tanto en semen fresco como criopreservado, se evidenció que una alta concentración de vitamina C

en el plasma seminal, produce una reducción de algunos parámetros de la calidad del semen asnal. Igualmente, Restrepo *et al.* (2014) encontraron una asociación significativa entre la concentración de vitamina C con los parámetros MT, MP, VCL y VAP en semen equino, presentando en todos los casos, coeficientes de correlación negativos, planteando así que existe un efecto deletéreo de la vitamina C del plasma seminal sobre la calidad post-descongelación. De igual forma la vitamina C, puede jugar un papel pro-oxidante, debido a que en presencia de metales de transición forma radicales altamente reactivos y más destructivos, y así mismo proliferando la generación de más radicales (Michael *et al.*, 2007). Por otra parte Jiang-Hong *et al.* (2010) precisa que se deben realizar mayores estudios del rol de la vitamina C sobre la calidad semen.

En otros trabajos realizados con vitaminas en los équidos, se reporta el uso de estas como suplementos en los diluyentes con una función antioxidante. Estos compuestos pueden ayudar a la estabilidad oxidativa de los espermatozoides, reduciendo la peroxidación lipídica, sin embargo no participan positivamente sobre parámetros de calidad seminal post-descongelación (Vasconcelos *et al.*, 2014; Vasconcelos *et al.*, 2013).

En este trabajo para el análisis de la Vitamina E, dada por niveles (medio, bajo y alto) se observó que el nivel medio confiere mejores resultados para los parámetros de MT, MP, VSL, VIT e IM en espermatozoides post-descongelados (Tabla III). Sin embargo, no se encontraron coeficientes de correlación significativos de la vitamina E con ninguno de los parámetros de calidad seminal (Tabla III). Acorde con lo anterior, en otros estudios donde se han evaluado diferentes concentraciones de vitamina E, tampoco se han encontrado efecto alguno (Yousefian *et al.*, 2014; Penitente-Filho *et al.*, 2014). De otro lado, Vasconcelos *et al.* (2013) encontraron que la vitamina E afecta negativamente la calidad seminal post-descongelación, lo cual fue dependiente de la concentración utilizada.

Pocos reportes presentan resultados de la composición lipídica del semen en los équidos. En los équidos la membrana plasmática de los espermatozoides está compuesta por lípidos, en su mayoría por ácidos grasos poliinsaturados (Grady *et al.*, 2009), en muchas especies, incluyendo los équidos, la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática se ha planteado como un factor que causa diferencias en la calidad del semen. Esto ocurre cuando los espermatozoides son almacenados o procesados, sin embargo, las razones fisiológicas y bioquímicas detrás de esta variabilidad siguen siendo inexplicables (Macías-García *et al.*, 2011). Estos mismos autores reportaron que una alta saturación de

fosfolípidos en las membranas de la célula espermática, se correlaciona con una baja calidad seminal, específicamente con la presencia de ácido esteárico. En una investigación se encontró que el ácido graso predominante en la membrana de los espermatozoides equinos es el ácido docosopentanoico (C22: 5 n-6), que representa un $49.9 \pm 8.7\%$ de todos los ácidos grasos, seguido por el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) (Macías-García *et al.*, 2011). Como se mencionó previamente, en la presente investigación el ácido esteárico (C18:0) estuvo presente en la mayoría de los eyaculados, sin embargo en diferentes muestras se observó un predominio proporcional de otros ácidos grasos como el ácido palmítico (C16:0), el ácido pentadecanoico (C15:0) e incluso el ácido oleico (C18:1) (Tabla II). En la evaluación por niveles realizada en la presente investigación, se observó que un alto nivel de ácido esteárico afecta la MT, MP, VCL, VSL Y VAP (tabla III). Adicionalmente, se encontró una correlación negativa entre el ácido esteárico del plasma seminal con la integridad de la membrana plasmática (Tabla IV). De otro lado Grady *et al.* (2009) evaluaron la suplementación de ácidos grasos en la dieta de ejemplares equinos y su relación con la calidad del semen en refrigeración y congelación, para lo cual no se encontró efecto alguno.

1.7 CONCLUSIONES

Existe una asociación negativa entre el contenido de vitamina C del plasma seminal y la calidad del semen asnal fresco y criopreservado. De igual forma, altos niveles de proteínas y ácido esteárico en el plasma seminal tienen un efecto deletéreo sobre la calidad seminal post-descongelación de asnos criollos colombianos.

1.8 RECOMENDACIONES

Realizar estudios donde se evalúen otros componentes del plasma seminal como otras vitaminas, iones, enzimas, entre otros, así como el aporte de los mismos sobre la capacidad antioxidante del semen asnal, de manera que pueda dilucidarse su efecto sobre la calidad

del semen fresco y post-descongelado. Por otra parte, sería valioso estudiar a profundidad posibles efectos determinantes en la variabilidad de la composición del plasma seminal, como podrían ser la alimentación, el manejo y el ambiente productivo.

2. Capítulo II.

ALTERNATIVAS DE SUPLEMENTACIÓN DE LOS DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE ASNOS CRIOLLOS COLOMBIANOS.

2.1 RESUMEN

Objetivo. Evaluar diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes de congelación sobre parámetros de calidad seminal post-descongelación de asnos criollos colombianos. **Materiales y métodos.** El semen de cinco asnos criollos colombianos (dos eyaculados por animal), fueron evaluados y criopreservados, empleando diluyentes con base a leche semidescremada, GLC, DMF, yema de huevo centrifugada al 2% y 5% y plasma seminal al 10% y 20%. Post-descongelación se realizó la evaluación de la calidad seminal y la peroxidación lipídica. Para el análisis estadístico se ajustaron modelos mixtos, análisis de regresión y la comparación de medias por la prueba de Tukey. **Resultados.** El experimento que incluyó DMF, yema de huevo al 5% y plasma seminal al 10%, presentó medias superiores ($P \leq 0.05$) para la mayoría de los parámetros de calidad seminal, respecto a los demás experimentos, con resultados de $64.32 \pm 16.68\%$, $41.76 \pm 15.15\%$, $52.37 \pm 11.12\%$, $43.13 \pm 8.86\%$ para MT, MP, VIT e IM, respectivamente. La peroxidación lipídica del semen post-descongelado fue menor al utilizar diluyentes suplementados con yema de huevo al 5%. **Conclusión.** La suplementación de los diluyentes de congelación con la combinación entre DMF, yema de huevo centrifugada y plasma seminal se constituye en la mejor alternativa para la congelación del semen asnal.

PALABRAS CLAVE: Crioprotector, yema de huevo, peroxidación lipídica, calidad seminal

2.2 ABSTRACT

Objective. To evaluate different supplementation alternatives in freezing extenders on post-thawed semen quality parameters in Colombian Creole donkeys. **Materials and methods.** Semen from five Colombian Creole donkeys (two ejaculates per animal) were evaluated and cryopreserved, using extenders based on reduced fat milk, GLC, DMF, centrifuged egg yolk at 2% and 5% and seminal plasma at 10% and 20%. Post-thawed, semen quality evaluation and lipid peroxidation were performed. For statistical analysis, mixed models were adjusted, regression analysis and comparison of means by the Tukey test were performed. **Results.** Experiment that included DMF, 5% egg yolk and 10% seminal plasma, presented higher means ($P \leq 0.05$) for most of semen quality parameters, compared to the other experiments, with results of $64.32 \pm 16.68\%$, $41.76 \pm 15.15\%$, $52.37 \pm 11.12\%$, $43.13 \pm 8.86\%$ for MT, MP, VIT and IM, respectively. Lipid peroxidation of post-thawed sperm, was lower when using supplemented extenders with 5% egg yolk. **Conclusion.** Freezing extenders supplementation with DMF, centrifuged egg yolk and seminal plasma combination, is the best alternative for freezing donkey semen.

KEYWORDS: Cryoprotectant, egg yolk, lipid peroxidation, semen quality

2.3 INTRODUCCIÓN

En varias partes del mundo, el semen de burro es utilizado en yeguas para la producción de mulares, los cuales son deseados en el medio rural, dado que reúnen las mejores características de las dos especies en un único animal (Santos, 1994, Oliveira *et al.*, 2014). Varias ventajas han sido atribuidas a la utilización de semen de burro descongelado en programas de inseminación artificial, algunas de éstas son la eliminación del rechazo de las yeguas por parte del comportamiento sexual de los burros durante el cortejo y el apareamiento, también el hecho de superar las limitaciones físicas con respecto al tamaño de los animales en el servicio y al fácil movimiento de los recursos genéticos (Madison *et al.*, 2013). Es así, como la congelación de semen asnal ha tenido un papel importante, mediante la creación de bancos de germoplasma que podrían ser utilizados en un futuro, para reducir la depresión genética observada en las poblaciones (Vilés-López, 2013). Los espermatozoides de los asnos han demostrado ser resistentes a los procesos de refrigeración y criopreservación, al mantener características adecuadas de calidad seminal (Vilés-López, 2013), sin embargo la congelación del semen se relaciona con daños en el espermatozoide, particularmente sobre la membrana plasmática y otras organelas (Ortiz *et al.*, 2014). En los procesos de criopreservación seminal, se adicionan sustancias de origen animal como la yema de huevo, constituida principalmente por colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad, que previenen la formación de cristales de hielo, protegiendo al espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación (Nouri *et al.*, 2013). Los crioprotectores permeables tienen la función de brindar a las células protección del estrés térmico, sin embargo pueden constituirse en un factor generador de estrés osmótico y oxidativo, que puede alterar los espermatozoides. De otro lado, la membrana plasmática de los espermatozoides equinos, contiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados muy susceptibles a la peroxidación lipídica, la cual altera la movilidad y la capacidad de fecundación, así como produce daño estructural de la membrana plasmática (Aitken, 1995; Aurich *et al.*, 1997; Mesa, 2010, Isachenko *et al.*, 2004).

En busca de soluciones al estrés oxidativo de los espermatozoides y con la finalidad de mejorar la fertilidad del semen criopreservado de équidos, se ha recurrido al uso de plasma seminal, como fuente de enzimas y otras moléculas antioxidantes (Ball, 2008). Sin

embargo, son escasos los estudios sobre la composición del plasma seminal asnal. Rota *et al.* (2012) reportan que no se conoce con certeza el efecto de la incorporación de plasma seminal de asnos en la calidad del semen post-descongelación, ni tampoco las propiedades del mismo, respecto al plasma de sementales equinos. De acuerdo a lo anterior, es importante que se evalúe la adición de plasma seminal en los procesos de congelación de semen, más aún cuando se tiene la concepción de una mayor calidad del semen de los burros respecto a los sementales equinos, de manera que incluso pueda ser empleado como suplemento para la criopreservación de semen de otros équidos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes alternativas de suplementación con GLC, DMF, yema de huevo centrifugada y plasma seminal, sobre la calidad post-descongelación del semen de asnos criollos colombianos (Objetivo específico 3).

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Localización. El material de investigación (semen de asnos) se recolectó en cinco predios dedicados a la cría de asnos de la raza criollo colombiano, localizados en los municipios de Caldas, La Estrella, Copacabana y Girardota del Valle del Aburrá, Antioquia (Colombia). Las muestras fueron procesadas y evaluadas en el laboratorio de Biotecnología animal del Centro de experimentación y laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid Sede Bello, y en el laboratorio de Química de los alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

2.4.2 Recolección y evaluación del material de investigación. Cinco ejemplares asnales (*Equus asinus*) de la raza criollo colombiano, se utilizaron para la recolección de dos eyaculados (fracción espermática) por animal, con un periodo de descanso sexual máximo de una semana, para un total de 10 eyaculados sobre los cuales se evaluaron los diferentes tratamientos. Los ejemplares se encontraban entre los 4 y 8 años de edad, todos en un régimen de mínimo una colecta semanal, con fertilidad comprobada con crías nacidas vivas y con una condición corporal de 7 a 8, en una escala entre 1 y 9, siendo 3 o menos considerado como extremadamente delgado y entre 8 y 9 como obeso (Warren, 2009).

La recolección del semen se realizó mediante el método de la vagina artificial, empleando una vagina modelo Missouri (Minitube), lubricada con gel no espermicida y sobre una yegua o burra, con la finalidad de aumentar la estimulación sexual del macho. La fracción en gel del eyaculado fue removida por filtración. El semen recién recolectado se diluyó en proporción 1:1 en un diluyente a base de leche semidescremadas, caseinatos, azúcares y antibióticos conocido comercialmente como Equipro® (Minitube) a 37°C, y otra fracción fue destinada a la extracción del plasma seminal mediante centrifugación a 850 x g durante 15 minutos, el material biológico se transportó hacia el laboratorio en un equipo especializado de refrigeración (Equitainer®, Minitube). A cada eyaculado recolectado se le realizaron evaluaciones movilidad, vitalidad, morfología e integridad de la membrana plasmática, mediante los métodos descritos más adelante para el semen descongelado. Como criterio de selección, solo fueron procesados los eyaculados con parámetros mínimos de 60% de movilidad progresiva y 100 millones de espermatozoides por mL (Pérez-Osorio *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2002).

2.4.3 Criopreservación del semen de asnales. La criopreservación del semen se realizó mediante un protocolo modificado de congelación (Medeiros *et al.*, 2002; Bustamante *et al.*, 2009). El semen diluido se centrifugó por 12 minutos a 850 x g y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en diluyente Equipro® suplementado con diferentes alternativas de suplementación (tratamientos), tal como se describe a continuación:

Tratamientos	Crioprotector	% de Crioprotector	% Plasma seminal	% Yema de huevo
1	GLC	3	10	2
2	GLC	3	20	2
3	GLC	3	10	5
4	GLC	3	20	5
5	DMF	5	10	2
6	DMF	5	20	2
7	DMF	5	10	5
8	DMF	5	20	5

Los crioprotectores que se utilizaron fueron glicerol (GLC) (Sigma-Aldrich) y *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich), la yema de huevo empleada para la suplementación de los medios de congelación corresponden a un protocolo modificado de Nouri *et al.* (2013), donde la yema de huevo fue diluida en una proporción de 3:1 con agua ultra-pura y fue centrifugada a 1600 x *g* durante 100 minutos. Todos los experimentos quedaron en cantidad suficiente para una concentración final de 100×10^6 de espermatozoides por mL.

Posteriormente, el semen diluido fue mantenido en refrigeración a 5°C por 60 minutos y luego se empacó en pajillas de 0.5mL, mediante un equipo automático de empaque y sellado de pajillas por ultrasonido (MRS1 Dual V2, IMV Technologies). Las pajillas luego fueron sometidas a vapores de nitrógeno líquido por 15 minutos, para finalmente ser almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido (IMV Technologies).

2.4.4 Evaluación de la calidad seminal

2.4.4.1 Evaluación de la movilidad. La movilidad espermática se evaluó mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA). Para esto se utilizó un procedimiento modificado del reportado por Hidalgo *et al.* (2005), empleando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon, Inc) con una cámara digital Scout SCA780 (Basler), adaptada a un computador dotado del software Sperm class analyzer (SCA[®]), motility and concentration (Microptic S.L.). Fueron analizados los parámetros: movilidad total, movilidad progresiva, velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), linealidad (LIN), rectitud (STR), índice de oscilación (IO), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida (BCF).

2.4.4.2 Evaluación de la vitalidad. La vitalidad (VIT) de los espermatozoides se determinó mediante el procedimiento descrito por Gamboa *et al.* (2010), con el kit Live/Dead (Molecular Probes Inc). Una suspensión de células (20×10^6 espermatozoides/mL) en solución Hanks Heppes (HH) con 1% de albúmina sérica bovina (BSA), se incubó por 8 minutos a 37°C con el fluorocromo para ácidos nucleicos SYBR14 (fluorescencia verde en todos los espermatozoides), a una concentración final de 6mM. Luego los espermatozoides fueron incubados de igual forma con el fluorocromo de ácidos nucleicos yoduro de propidio (fluorescencia roja en células muertas,) a 0.48mM. Muestras de 5µL de espermatozoides

fueron puestas en un portaobjetos de vidrio, con un respectivo cubreobjetos, y 200 células se contaron mediante un microscopio E200 con fluorescencia HBO (Nikon Inc.).

2.4.4.3 Morfología. La morfología anormal (MA) se evaluó mediante el conteo de 200 espermatozoides teñidos por la técnica de eosina-nigrosina modificada por Barth y Oko (1989) y Brito *et al.* (2011), sobre un portaobjetos temperado a 37°C en una platina térmica, se depositó una gota de semen y a su lado una gota de colorante eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich 861006 y N4763) a 37°C. Ambas gotas se mezclaron durante 30 a 60 segundos, se realizó un extendido y la fijación del mismo con calor sobre una platina térmica. Se observó la morfología individual de 200 espermatozoides al microscopio (1000X) y se clasificaron como morfológicamente normales o anormales (Graham y Mocé, 2005).

2.4.4.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (HOS). Se evaluó la integridad de la membrana plasmática (IM) de los espermatozoides por una metodología modificada de la prueba hipoosmótica (HOS) reportada por Neild *et al.* (1999). Se tomaron 100 µl de semen y se adicionaron a un tubo con 500 µl de una solución hipoosmótica de sacarosa 5.4% (100 mOsmol/L). Esta mezcla se incubó a 38.5°C por 30 minutos y luego se evaluó la reacción (turgencia) de 200 células en mínimo 5 campos diferentes (400X), utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc.).

2.4.4.5 Evaluación de la peroxidación lipídica. Las muestras de semen congelado con sus respectivos experimentos se descongelaron a 37°C durante 1 minuto (1000µL), luego se centrifugaron a 600 x g por 10 minutos para separar los espermatozoides móviles del plasma seminal y del diluyente de congelación, el pellet con aproximadamente 100×10^6 células, fue resuspendido en 1mL de buffer fosfato de sodio 75 mM pH 7.4, que contenía la sonda C₁₁-BODIPY^{581/591} (Molecular Probes Inc), en una concentración de 10 µM (10 µ de Sonda 2 mM en 1000µL de Buffer), (Ortega Ferrusola *et al.* (2009). Después de teñir las muestras con C₁₁ - BODIPY^{581/591} (Molecular Probes Inc), se dividieron en alícuotas de 300µL para tener triplicados en una microplaca de 96 pocillos y se determinó la fluorescencia con un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS-55[®]), se hicieron 10 lecturas cada 15 minutos hasta 120 minutos para fluorescencia roja y verde. Entre tiempos se mantuvieron las placas a temperatura ambiente. Para determinar la fluorescencia roja y verde de C₁₁-BODIPY^{581/591} cada pozo fue evaluado en las siguientes longitudes de onda de excitación y emisión: rojo, excitación 590nm y emisión 635nm; verde, excitación 485nm y la emisión de 535nm. Para medir el grado de peroxidación lipídica de las células

espermáticas se determinaron relaciones entre la fluorescencia roja y verde (Ball y Vo, 2002).

2.4.5 Diseño estadístico. Se realizó un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados mediante el ajuste de modelos mixtos para cada variable dependiente de calidad seminal. En cada modelo se incluyeron los efectos fijos de: asno, eyaculado y tratamiento. Para la evaluación de la peroxidación lipídica se realizó en modelo mixto de medidas repetidas y un análisis de regresión con la inclusión del efecto del tiempo. Para asegurar la normalidad de los datos se utilizó prueba de Shapiro-Wilk y se realizaron transformaciones logarítmicas. Las comparaciones de medias entre los experimentos, se realizaron mediante la prueba de Tukey. Todas las evaluaciones se realizaron con el programa SAS 9.2.

2.5 RESULTADOS

Un total de 10 muestras de semen fresco de asnales (2 eyaculados por animal) fueron evaluadas y procesadas. El promedio para los parámetros espermáticos del semen fresco fueron de: movilidad total de $92.24 \pm 7.14\%$, movilidad progresiva $68.25 \pm 12.08\%$, VCL $117.85 \pm 19.53\mu\text{m}/\text{seg.}$, VSL $49.89 \pm 8.78\mu\text{m}/\text{seg.}$, VAP $84.46. \pm 17.66\mu\text{m}/\text{seg.}$, VIT $88.20 \pm 6.47\%$ e IM $63.9 \pm 6.0\%$. La Tabla V, presenta las medias generales para los parámetros de calidad seminal post-descongelación.

Tabla V. Medias generales para parámetros de calidad seminal post-descongelación.

VARIABLE	N	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Error estándar	Máximo	Mínimo
MT (%)	320	34.17	22.63	66.22	1.26	96,39	1,59
MP (%)	320	22.05	17.33	78.63	0.97	78,55	0
VCL ($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	320	86.33	20.84	24.14	1.16	152,29	32,57
VSL ($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	320	62.10	18.48	29.76	1.03	121,55	80,6
VAP ($\mu\text{m}/\text{seg.}$)	320	74.47	20.95	28.13	1.17	139,16	17,12
LIN (%)	320	71.11	8.41	11.82	0.47	90,71	24,74
STR (%)	320	83.02	6.02	7.25	0.34	95,79	47,04
IO (%)	320	85.42	5.45	6.39	0.30	95,23	52,58
ALH (μm)	320	24.49	0.40	16.46	0.02	4,74	0
BCF (Hz)	320	8.43	1.09	12.95	0.06	11,48	0
VIT (%)	320	34.11	14.00	41.05	0.78	75	8
MA (%)	320	15.02	5.86	39.04	0.33	32	4
IM (%)	320	26.73	12.18	45.57	0.68	66	7

La comparación entre crioprotectores, niveles de yema de huevo y plasma seminal sobre parámetros de calidad post-descongelación se encuentran descritos en la Tabla VI. El tratamiento 7 evidenció diferencias ($P \leq 0.05$) para la MT, MP e IM, respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos que incluyeron GLC presentaron valores inferiores para la mayoría de los parámetros de calidad seminal post-descongelación. La Tabla VII presenta el análisis de regresión para la peroxidación lipídica.

Tabla VI. Comparación de medias de los tratamientos (Media \pm DE)

VARIABLE	TRATAMIENTOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
MT (%)	22.83 \pm 13.95a	18.12 \pm 20.16a	28.85 \pm 17.14b	22.49 \pm 5.07ab	43.6 \pm 18.45c	23.74 \pm 16.68ab	64.32 \pm 16.68d	49.39 \pm 18.88c
MP (%)	14.46 \pm 11.50a	11.7 \pm 17.05b	19.49 \pm 13.54a	13.54 \pm 10.52c	28.3 \pm 15.73d	14.54 \pm 17.15a	41.76 \pm 17.15e	32.48 \pm 16.47d
VCL (μ m/seg.)	79.97 \pm 16.43ab	78.6 \pm 25.75a	87.67 \pm 21.52ab c	80.03 \pm 21.77ab	89.69 \pm 16.19bc	91.31 \pm 22.24c	94.02 \pm 22.24c	89.36 \pm 16.99bc
VSL (μ m/seg.)	60.17 \pm 15.90ab	57.13 \pm 21.64b	68 \pm 20.24a	59.68 \pm 19.88ab	63.65 \pm 15.23 ab	64.82 \pm 19.92ab	61.48 \pm 19.92ab	61.83 \pm 14.37ab
VAP (μ m/seg.)	69.74 \pm 16.94a b	67.9 \pm 25.84b	77.75 \pm 21.60ab	69.85 \pm 21.82ab	77.26 \pm 16.88a	78.12 \pm 22.85a	79.04 \pm 22.85a	76.14 \pm 17.14ab
LIN (%)	74.45 \pm 5.77ab	71.12 \pm 11.73bc	76.22 \pm 7.95a	73.33 \pm 7.59abc	70.45 \pm 6.53bc	70.15 \pm 7.36bc	64.4 \pm 7.36d	68.75 \pm 5.72dc
STR (%)	85.97 \pm 3.57ab	83.5 \pm 9.01abc d	86.64 \pm 5.20a	84.88 \pm 4.84abc	82.1 \pm 4.44dc	82.68 \pm 5.04bcd	77.29 \pm 5. 04e	81.11 \pm 4.12d
IO (%)	86.63 \pm 4.03ab	84.51 \pm 7.78b	87.73 \pm 4.93a	86.22 \pm 5.40ab	85.73 \pm 4.21abc	84.7 \pm 5.30bc	83.13 \pm 5.30c	84.67 \pm 3.94bc
ALH (μ m)	2.24 \pm 0.2a	2.3 \pm 0.54ab	2.23 \pm 0.26a	2.28 \pm 0.29ab	2.49 \pm 0.30bc	2.78 \pm 0.27d	2.71 \pm 0.27cd	2.55 \pm 0.24c
BCF (Hz)	8.82 \pm 0.86a	8.06 \pm 1.73ab	8.93 \pm 1.58a	8.8 \pm 0.92a	8.16 \pm 0.61b	8.51 \pm 0.45c	7.92 \pm 0.45bcd	8.24 \pm 0.67bd
VIT (%)	24.02 \pm 7.64a	25.28 \pm 14.19a	36.1 \pm 12.71a	29.43 \pm 10.35b	37.3 \pm 11.16a	29.6 \pm 11.12a	52.37 \pm 11.12c	38.78 \pm 8.04b
MFA (%)	15.05 \pm 4.57a	15.73 \pm 6.57a	15.28 \pm 6.36a	14.9 \pm 5.26ab	14.93 \pm 5.53ab	12.95 \pm 6.33b	15.72 \pm 6.33a	15.57 \pm 6.30a
HOS (%)	20.87 \pm 7.43a	20.8 \pm 10.95a	25.33 \pm 10.21b	21.5 \pm 10.84ab	30.43 \pm 9.15c	20.08 \pm 8.86a	43.13 \pm 8.86d	31.72 \pm 11.08c

Promedios con letras diferentes denotan diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos

Tabla VII. Regresión de la peroxidación lipídica.

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>INTERCEPTO β_0</i>	<i>TIEMPO β_1</i>	<i>P\leq0.05</i>
1	3.40	0.0031	0.101
2	3.58	0.0064	0.566
3	4.44	0.0054	0.031
4	4.57	0.0069	0.035
5	3.10	0.0053	0.0021
5	3.66	0.0069	0.012
7	4.38	0.0075	0.0012
8	4.24	0.0077	0.002

β_1 : Incremento de la relación de la peroxidación lipídica por minuto.

La tabla VIII presenta la relación de peroxidación del semen para los diferentes experimentos. El grado de peroxidación correspondió a la relación entre la fluorescencia roja y verde. Una relación fluorescencia Roja/Verde aumentada o constante, denota la no oxidación de la muestra, mientras una relación de fluorescencia Roja/Verde disminuida, denota la oxidación de la muestra.

Tabla VIII. Comparación de medias de la relación de peroxidación lipídica en espermatozoides de asnos criollos. (Media \pm DE)

TRATAMIENTO	RELACIÓN DE PEROXIDACIÓN
1	3.63 \pm 0.89a
2	4.03 \pm 1,57b
3	4.82 \pm 1.20c
4	5.06 \pm 1.56c
5	3.48 \pm 0.88a
6	4.15 \pm 1.31b
7	4.91 \pm 1.12c
8	4.79 \pm 1.19c

Promedios con letras diferentes denotan diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos

2.6 DISCUSIÓN

La crioconservación es una técnica que consiste en mantener gran variedad de células a baja temperatura sin perder su viabilidad y utilidad, tiene como objetivo inhibir la actividad metabólica del semen, garantizando su vitalidad y función a través del tiempo, logrando conservarlo indefinidamente (Cruz *et al.*, 2006). La yema de huevo es un componente común de los diluyentes de congelación de semen en animales domésticos (Jian-Hong *et al.*, 2011). Pace y Graham (1974) purificaron la yema de huevo por ultra-centrifugación y observaron que la fracción de LDL muestra una propiedad crioprotectora. En una investigación desarrollada en equinos por Nouri *et al.*, (2013) utilizaron niveles de suplementación de yema de huevo centrifugada al 2 y 4% en los diluyentes de congelación, con diferencias estadísticas para los parámetros de MP, MT, VSL e IM, a favor de la yema centrifugada al 2%. En el presente estudio con asnos criollos colombianos, se encontró que la inclusión de yema de huevo centrifugada al 5%, confiere mejores resultados para la MP, MT, VIT e IM (Tabla VI), esto mismo fue encontrado por Jepsen *et al.*, (2010) quienes

reportan buenos resultados usando una concentración de yema de huevo del 5% en los diluyentes de congelación.

Podría considerarse que concentraciones altas de yema de huevo en los diluyentes de congelación, podrían desencadenar procesos de peroxidación lipídica en el medio y por consiguiente en las membranas plasmáticas de los espermatozoides, lo cual sería atribuible no solo a lípidos de la membrana plasmática, sino también a los lípidos presentes en la yema de huevo. En equinos la peroxidación lipídica de los espermatozoides es considerada como el principal factor de daño durante la criopreservación (Agarwall y Said, 2005; Aitken *et al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio se observó que a mayor contenido de yema de huevo, se presentó una mayor relación de peroxidación lipídica, lo que significa que para los tratamientos 3, 4, 7 y 8, la peroxidación lipídica fue menor (Tabla VIII). En consecuencia con lo anterior, estos mismos tratamientos presentaron valores superiores para la mayoría de parámetros de calidad seminal post-descongelación (Tabla VI). Las LDL presentes en la yema de huevo se adhieren a la membrana plasmática de la célula espermática, dotando al espermatozoide de una mayor protección ante los fenómenos de cambios en la temperatura por la congelación (Morillo-Rodríguez 2013).

El glicerol es el crioprotector mas empleado en la congelación de semen de diferentes especies, incluyendo los équidos (Buranaamnuay *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2011). Un trabajo de Pillet *et al.* (2011) en equinos demuestra que utilizar concentraciones de GLC al 2.5%, permite alcanzar movilidades progresivas post-descongelación entre el 39% y el 41%. Estos resultados no son acordes a los encontrados en este estudio, toda vez que el mejor porcentaje de movilidad progresiva de los tratamientos, cuando se suplementó con glicerol, fue del $19.49 \pm 13.54\%$ (Tabla VI). Por otra parte Morillo- Rodríguez *et al.* (2011) con la adición de glicerol, encontraron valores de $23.5 \pm 12.39\%$, $32.5 \pm 6.7 \mu\text{m}/\text{seg.}$, $17,5 \pm 3.49 \mu\text{m}/\text{seg.}$ y $12.9 \pm 3.30 \mu\text{m}/\text{seg.}$, para la MT, VCL, VAP y VSL, respectivamente; resultados que en algunos casos fueron equiparables y en otros inferiores a los encontrados en este investigación (Tabla VI). Adicionalmente el GLC es un compuesto que genera toxicidad para los espermatozoides (Fahy *et al.*, 1990) y esta toxicidad genera alteraciones que involucran la fertilidad de las células espermáticas (Amann y Pickett, 1987; Squires *et al.*, 2004).

La DMF se ha estudiado como agente crioprotector, debido a sus propiedades físico-químicas que permiten una alta difusión a través de la membrana celular (Restrepo *et al.*,

2012), además no se comportan como una sustancia tóxica para el espermatozoide durante el proceso de congelación (Alvarenga *et al.*, 2005). En la presente investigación se observó que los diluyentes suplementados con DMF al 5%, tuvieron mejores resultados para diferentes parámetros de la calidad seminal. Entre éstos, el tratamiento 7 presentó valores superiores para la MT, MP, VIT e IM, respecto a los demás tratamientos (Tabla VI). Acha *et al.* (2015) reportan que utilizar la DMF como crioprotector en espermatozoides de burros de la raza Andaluz, tiene un efecto positivo sobre la MT, MP, e IM con valores de $66,21 \pm 2.60\%$, $57.09 \pm 2.99\%$ y $64.95 \pm 3.77\%$, respectivamente, siendo estos valores equiparables a los encontrados en el tratamiento 7 de esta investigación. Por otra parte, en el tratamiento 7 los valores de STR y LIN se vieron reducidos, situación que en el estudio de Morillo-Rodríguez (2012) también se observó mediante el uso de DMF. Como explicación a este fenómeno, según estos mismos autores, la reducción en dichos parámetros es debida al incremento de la VCL. De igual forma, Morillo-Rodríguez (2012) reportan que la VIT fue mayor al utilizar la DMF como crioprotector. El uso de crioprotectores de menor peso molecular como la DMF, reduce el daño osmótico y los daños subletales que produce sobre las células espermáticas (Ortega-Ferrulosa *et al.*, 2008; Macías-García *et al.*, 2011).

En este estudio se evaluó la suplementación de los diluyentes con plasma seminal a dos concentraciones, al 10 y 20%. Existen componentes del plasma seminal que causan efectos negativos sobre los parámetros de la calidad seminal, sin embargo el rol de este plasma es aún bastante desconocido (Rota *et al.*, 2012). Por otra parte, otros trabajos reportan que el plasma seminal soporta funciones del espermatozoide como la movilidad, la viabilidad y la capacitación (Munjunath, 2012). Puede observarse en este trabajo que los experimentos con niveles de suplementación del plasma al 10%, mostraron mejores resultados para la MP y la MT, tanto en los diluyentes con GLC, como en aquellos suplementados con DMF (Tabla VI). Sin embargo, cuando se realizó la suplementación con 20% de plasma seminal, se observaron efectos perjudiciales sobre diferentes parámetros de calidad seminal. Munjunath (2012) y Morrel *et al.* (2012) igualmente encontraron una alteración por efecto del plasma seminal al 20%, sobre la movilidad y la vitalidad espermática, y de forma adicional evidenciaron efectos negativos sobre la capacitación y la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

Como proyección de los resultados de esta investigación, sería factible pensar la utilización de plasma seminal como un factor mejorador de la criopreservación, del semen de animales subfértiles o incluso de animales de otras especies. Lozano-Benito *et al.* (2011) encontraron que espermatozoides equinos que exhibían bajas movilidades post-descongelación (<20%), suplementados con plasma seminal de reproductores con altos índices de criotolerancia (movilidad $\geq 30\%$), mejoraron su calidad post-descongelación. Pero en otra investigación, con sementales con buena calidad seminal post-descongelación, la adición del plasma seminal de caballos con baja calidad espermática disminuyó la movilidad progresiva post-descongelación (Aurich *et al.*, 1996).

De otro lado, Alghamdi *et al.* (2002) demostraron que la adición de plasma en concentraciones bajas (<5%) mejora la calidad del semen congelado, pero no sucede lo mismo al emplearlo en concentraciones mayores (20-30%), siendo esto acorde con lo encontrado en este estudio. Según Moore (2005) la criopreservación con más del 80% de plasma seminal no altera la movilidad espermática en semen equino, siendo este planteamiento contrario a lo observado en esta investigación, donde en general los experimentos suplementados con 20% de plasma seminal mostraron una reducción en los parámetros de la calidad seminal (Tabla VI). (Lozano-Benito *et al.*, 2011) reportan que un 10% es la mejor proporción para suplementar el semen con plasma seminal, debido a que confiere buenos resultados de calidad post-descongelación.

2.7 CONCLUSIÓN

La suplementación de los diluyentes de congelación con la combinación entre DMF, yema de huevo centrifugada y plasma seminal se constituye en la mejor alternativa para la congelación de semen asnal. Los niveles de suplementación que presentan mejores resultados de calidad seminal post-descongelación, son plasma seminal al 10% y yema de huevo centrifugada al 5%. La adición de yema de huevo al 5% genera menores niveles de peroxidación lipídica en el semen asnal criopreservado.

2.8 RECOMENDACIONES

Realizar estudios del efecto del plasma seminal sobre la sobrevivencia en el tiempo de los espermatozoides, podría facilitar aspectos técnicos en los procesos de inseminación artificial.

Bibliografía de la introducción

ALI M, BABER M, HUSSAIN T, AWAN F, NADEEM A. The contribution of donkeys to human health. *Equine Veterinary Journal*. 2014; 46:766–7.

BALL B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107: 257-267.

BALL BA, GRAVANCE CG, MEDINA V, BAUMBER J, LIU IK. Catalase activity in equine semen. *American Journal of Veterinary Research*. 2000; 61:1026-69.

BAUMBER J, BALL B, GRAVANCE C, MEDINA V, DAVIES-MOREL M. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*. 2000; 21(6):895-902.

BAUMBER J, BALL B. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *American Journal of Veterinary Research*. 2005; 66(8):1415–1419.

BENSON JD, WOODS EJ, WALTERS EM, CRITSER JK. The cryobiology of spermatozoa, *Theriogenology*. 2012; 78:682–1699.

BURDEN F, THIEMANN A. Donkeys Are Different. *Journal of equine Veterinary Science*. 2015; 35: 376-382.

CANISSO IF. Comportamento sexual, Parâmetros Seminais e Fertilidade do semen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pega. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Viçosa: Universidade Federal de Vicosa. 2008; 200.

CRUZ P, MEDINA V ROBLES, VELASCO Y. 2006 Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006; 19(2):153-159.

GUASTI PN, MONTEIRO GA, PAPA FO. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. Veterinária e Zootecnia. 2012; 19(2): 169-180.

KARESKOSKI M, KATILA T. Components of stallion seminal plasma and effects of seminal plasma on sperm longevity. Animal Reproduction Science. 2008; 107: 249-256.

KRAUSE D, GROVE D. Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. Journal Reproduction Fertility. 1967; 14: 139-141.

LOZANO-BENITO D, GIL HUERTA L, ALCAREZ SAN MARTIN C. Efecto de la adición del plasma seminal en el semen equino descongelado. Sanidad Militar 2011; 67(3): 284-290.

MADISON J, EVANS LE, YOUNGS CR. The effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. Journal of equine Veterinary. 2013; 33: 272-278.

MEDEIROS A, GOMES G, CARMO M, PAPA F, ALVARENGA M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. Theriogenology. 2002; 58(2):273-276.

MEMBRILLO A., CÓRDOVA A, HICKS J, OLIVARES-CORICHI I., MARTÍNEZ V, VALENCIA J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. INCI. 2003; 28(12):699:704.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. SIEMBRA.CADENA EQUINA, ASNAL Y MULAR- Investigación para crioconservación de semen en Colombia. Disponible en www.siembra.gov.co . Consultado el 25 de octubre de 2013.

MORILLO-RODRIGUEZ A. Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Departamento de medicina animal. 2013. Universidad de Extremadura.

NOURI H, TOWHIDI A, ZHANDI M, SADEGHI R. The effects of centrifugated egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze Caspian horse semen. Journal of Equine Veterinary Science. 2013; 33: 1050-1053.

OLIVEIRA RR, RATES DM, PUGLIESI G, KER PG, ARRUDA RP, MORAES EA, CARVALHO GR. Use of Cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen Cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. *Reproduction domestic animal*. 2014; 49: 845-850

POLGE C, MINOTAKIS C. Deep freezing of jackass and stallion semen. V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. 1996; 545-552.

ROSSEL S, MARSHALL F, PETERS J, PILGRAM T, ADAMS MD, O'CONNOR Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105:3715–20.

ROTA A, PANZINI D, SABATINI C, CAMILLO F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*. 2012; (78):1846-1854.

SANTOS GF. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5°C. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.1994; 82.

VIDAMENT M, VINCENT P, MARTIN FX, MAGISTRINI M, BLESBOIS E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*. 2009, 112:22-35

Bibliografía del capítulo I.

AKAWAGA M, SUYAMA K, UCHIDA K. Fluorescent detection of α -amino adipic and γ -glutamic semialdehydes in oxidized proteins. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 46(6):701-706

AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*. 1997; 48(2):185-192

BALL B. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A review. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2008; 28(11):650-665.

BARTH A, OKO R. Anormal morfology of bovine spermatozoa. 1 ed. Iowa: Iowa state University press; 1989.

BOE-HANSEN GB, REGO JPA, CRISP JM, MOURA AA, NOUWENS AS, LI Y, VENUS B, BURNS BM, MCGOWAN MR. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Animal Reproduction Science*. 2015;162: 20-30.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254.

BRITO L, GREENE L, KELLEMAN A, KNOBBE M, TURNER R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*. 2011; 76:745–750.

BUCCI D, GIARETTA E, SPINACI M, RIZZATO G, ISANI G, MISLEI B, MARI G, TAMANINI C, GALEATI G. Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. 2015. *Theriogenology*. Accepted manuscript.

BUSTAMANTE I, PEDERZOLLI C, SGARAVATTI A, GREGORY R, DUTRA C, JOBIM M, MATTOS RC. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 2009; 6(2):392-399.

CARVER DA, BALL BA. Lipase activity in stallion seminal plasma and effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 8C. *Theriogenology*. 2002;58:1587–95.

CONTRI A, ALESSIA G , DOMENICO R, MICHELE PIO SFIRRO M, CARLUCCIO A. Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animal reproduction science*. 2012; 136:74-80

GRADY ST, CAVINDER CA, BRINSKO SP, FORREST DW, SAWYER JE, SCOTT BD. Dietary supplementation of two varying sources of n-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. *The Professional Animal Scientist*. 2009; 25:768–773.

GRAHAM J, MOCÉ E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005; 64(3):492-504.

GUASTI PN, SOUZA FF, SCOTT C, HARTWIG FP, PAPA MP, DOS SANTOS GAM, FREITAS-DELLAQUA CP, PAPA FO. Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014;34:84-85.

HÄRTLOVA H, RAJMON R, KRONTORÁDOVÁ I, MAMICA J, PETRA KLABANOVÁ LZ, CEMOCKY A. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Veterinaria Brunensis*. 2013;82: 31-35

HENRY M, SNOECK P, COTTORELLO A. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 2002; 58(2):245-248.

HIDALGO M, RODRIGUEZ I, DORADO J, SANZ J, SOLER C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine-Czech* 2005;50(1):24-32.

JIAN-HONG H, HUA, WAN-QIANG T, XIAN-LIN Z, LIN-SEN Z, HUI W, QING-WANG L A,D, YA-PING X. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*. 2010; 121:72-77

KARESKOSKI M, KATILA T. Components of stallion seminal plasma and effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107: 249-256.

MACÍAS-GARCÍA B, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ L, ORTEGA FERRUSOLA C, SALAZAR-SANDOVAL C, MORILLO RODRÍGUEZ A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H, TAPIA JA, MORCUENDE D, PEÑA JA. Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 141-148.

MEDEIROS A, GOMES G, CARMO M, PAPA F, ALVARENGA M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 2002; 58(2):273-276.

MEMBRILLO-ORTEGA A., CÓRDOVA A, HICKS J, OLIVARES-CORICHI I., MARTÍNEZ V, VALENCIA J. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INCI*. 2003; 28(12):699:704.

MICHAEL A, ALEXOPOULOS C, PONTIKI E, HADJIPAVLOU-LITINA D, SARATSIS P, BOSCOS C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68(2):204-12.

MIRÓ, J.; TABERNER, E; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*. 2009; 72:1017-1022.

MONTEIRO GA, PAPA FO, ZAHN FS, DELL'AQUA JA, MELO CM, MAZIERO RR, AVANZI MA, ALVARENGA MA, GUASTI PN. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 2011; 127:197-201.

MONTEIRO GA, PAPA FO, ZAHN FS, DELL'AQUA JA, MELO CM, MAZIERO RR, AVANZI MA, ALVARENGA MA, GUASTI PN. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 2011; 127:197-201.

MORRELL JM, GEORGAKAS A , LUNDEHEIM N, NASH D , DAVIES MOREL MC , JOHANNISSON A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology*. 2014; 82: 176-183

MORTE MI, RODRIGUES AM, SOARES D, RODRIGUES AS, GAMBOA S, RAMALHO-SANTOS J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Animal Reproduction Science*. 2008; 106(1-2):36-47.

NEILD D, CHAVES G, FLORES M, MORA N, BECONI M, AGIIERO A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 1999; 51: 721-727.

NOVAKOVA L, SOLICH P, SOLICHOVA D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. (2008). *Trends in Analytical Chemistry*. 2008,27 (10): 942 – 958.

OLIVEIRA RR, RATES DM, PUGLIESI G, KER PG, ARRUDA RP, MORAES EA, CARVALHO GR. Use of Cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen Cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. *Reproduction Domestic Animal*. 2014; 49: 845-850

ORTIZ I , DORADO J , RAMÍREZ L , MORRELL JM , ACHA D, URBANO M, GÁLVEZ MJ, CARRASCO JJ , GÓMEZ-ARRONES V,CALERO-CARRETERO R, HIDALGO M. Effect of single layer centrifugation using Androcoll-E-Large on the sperm quality parameters of cooled-stored donkey semen doses. *Animal*. 2014; 8(2): 308-315

PAPA FO, MELO CM, FIORATTI EG, DELL'AQUA JA, ZAHN FS, ALVARENGA MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107:293-301.

PENITENTE-FILHO JM, OLIVEIRA FA, RODRIGUEZ -JIMENEZ C, CARRASCAL E, OLIVEIRA-DIAS JC , GD, RENATA GOMES-SILVEIRA R, CAMILA OLIVEIRA SILVEIRA C, ALVES TORRES CA. Association of vitamin E with rapid thawing on goat semen. *The Scientific World Journal*. 2014; 33: 1-5.

PEREZ-OSORIO J, MELLO F, JULIANI G, LAGARES M, LAGO L, HENRY M. Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction*. 2008; 3/4 (5): 103-109.

RAMIRES NETO C, MONTEIRO GA, SOARES RF, PEDRAZZI C, DELL'AQUA JR. JA, PAPA FO, CASTRO-CHAVES MM, ALVARENGA MA. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. 2013a; 79: 1120-1123.

RAMIRES-NETO C, MONTEIRO GA, FATIMA-SOARES R, CESAR PEDRAZZI R, JOSE ANTONIO DELL'AQUA JR JA , PAPA FO, ALVARENGA MA. Effect of removing seminal plasma using a sperm filter on the viability of refrigerated stallion semen. *Journal of equine veterinary science*. 2013b; 33:40-43.

RESTREPO G, USUGA A, MONTOYA J, DUQUE J, ZAPATA K, ROJANO B. Influencia de la concentración de vitamina C sobre la calidad del semen equino criopreservado. *Memorias Congreso Panamericano de la Ciencias Veterinarias*. 2014.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H, KVIST U, ERNERUDH J, SANZ L, CALVETE JJ .Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal reproduction Immunology*. 2011; 66:11-22.

SERRES C, RODRÍGUEZ A, ALVAREZ AL, SANTIAGO I, GABRIEL J, GÓMEZCUE´TARA C, MATEOS E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leones donkey semen. *Theriogenology*. 2002; 58:329–32.

VASCONCELOS JS, FRANCO MS, CHAVEIRO A, ANA GÓIS A., FERNANDO MOREIRA DA SILVA F. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after Cryopreservation. *Journal of equine veterinary*. 2013; 33: 787-793.

VASCONCELOS S, CHAVEIRO A, GOIS B, MOREIRA DA SILVA F. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of equine veterinary*. 2013; 33:787-793.

WAHEED M, EL-BAHR SM, AL-HAIDER AK. Influence of Seminal Plasma Antioxidants and Osteopontin on Fertility of the Arabian Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013;33:705-709.

WAGNER KH, WOTRUBA F, ELMADFA I. Antioxidative potential of tocotrienols and tocopherols in coconut fat at different oxidation temperatures. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2001; 103: 746–751.

WARREN L. Feeding the stallion. Alberta Agriculture and Rural Development. Alberta, USA, 2009.

YOUSEFIAN I, ZARE-SHAHNEH A, ZHANDI M. The effect of coenzyme q10 and a-tocopherol in skim milk-based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. Journal of Equine Veterinary Science. 2014; 34: 949-954

ZAPATA LUJÁN A, COGOLLO PACHECO A, ROJANO BA. Potencial nutracéutico del aceite de la almendra de choibá o almendro de montaña (*Dipteryx oleifera* Benth.) Nutraceutical potential of Choibá almond oil or mountain almond (*Dipteryx oleifera* Benth.). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013; 18(3), 368–380.

Bibliografía del capítulo II.

ACHA D, HIDALGO M, ORTIZ I, GALVEZ MJ, CARRASCO JJ, GOMEZ-ARRONES V, DORADO J. Freeze ability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. *Reproduction fertility and development*. 2015.

AGARWALL A, SAID TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility a clinical approach. *BJU International*. 2005; 95:503–507.

AITKEN R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995; 7(4):659-668.

AITKEN RJ, WINGATE JK, DE IULIUS GN, MCLAUGHLIN EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Molecular Human Reproduction*. 2007; 13:203–211.

ALGHAMDI AS, TROEDSSON MH, XUE JL, CRABO BG. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on post-thaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal Veterinary Research*. 2002; 63:880-5.

ALVARENGA MA, PAPA FO, LANDIM-ALVARENGA FC, MEDEIROS AS. Amides of cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*. 2005; 89(1-4): 105-113.

AMANN RP, PICKETT BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine Veterinary Science*. 1987; 7: 145-173.

AURICH JE, KÜHNE A , HOPPE H & A URICH C. S eminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*. 1996; 46: 791–797.

AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*. 1997; 48(2):185-192.

BALL B. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107: 257-267.

BALL BA, VO A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C₁₁-BODIPY^{581/591}. *Journal of andrology*. 2002; 23(2): 259-263.

BARTH A, OKO R. Anormal morfology of bovine spermatozoa. 1 ed. Iowa: Iowa state University press; 1989.

BRITO L, GREENE L, KELLEMAN A, KNOBBE M, TURNER R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*. 2011; 76:745–750.

BURANAAMNUAY K, GROSSFELD R, STRUCKMANN C, RATH D. Influence of cryoprotectants glycerol and amines , combined with antioxidants on quality of frozen.-thawed boar sperm. *Animal reproduction science*. 2011; 127:56-61.

BUSTAMANTE I, PEDERZOLLI C, SGARAVATTI A, GREGORY R, DUTRA C, JOBIM M, MATTOS RC. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Animal Reproduction*. 2009; 6(2):392-399.

CRUZ P, MEDINA V ROBLES, VELASCO Y. 2006 Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006; 19(2):153-159.

FAHY GM, LILLEY TH, LINSDELL H, DOUGLAS MS, MERYMAN HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*. 1990: 247-268.

GAMBOA S, RODRIGUES A, HENRIQUES L, BATISTA C, RAMALHO-SANTOS J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2010; 73(7):950-958.

GRAHAM J, MOCÉ E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 2005; 64(3):492-504.

HENRY M, SNOECK P, COTTORELLO A. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 2002; 58(2):245-248.

HIDALGO M, RODRIGUEZ I, DORADO J, SANZ J, SOLER C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine-Czech* 2005;50(1):24-32.

HOFFMANN N, ONDELHOLF H, MORANDINI C, ROHN K, SIEME H. Optimal concentration of cryoprotectant agent for freezing stallion that are classified "good" or "poor" for freezing. *Animal Reproduction Science*. 2011. 125(1-2) 112-118.

ISACHENKO V, ISACHENKO E, KATKOV II, MONTAG M, DESSOLE S, NAWROTH F, VAN DER VEN H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biology of Reproduction*. 2004; 71 (4): 1167–1173.

JEPSEN R, EVANS L, YOUNGS C. Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with frozen-thawed semen from standar Jack. *Journal equine veterinary science*. 2010; 30(11): 651-656.

JIAN-HONG H, ZHONG-LIANG J, RUI-KAI L, QING-WANG L, SHU-SHAN Z , LIN-SEN Z, YAO-KUN L, XIN L, The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*.2011; 62: 83-87.

LOZANO-BENITO D, GIL HUERTA L, ALCAREZ SAN MARTIN C. Efecto de la adición del plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanidad. Militar*. 2011; 67(3): 284-290.

MACÍAS-GARCÍA B, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ L, ORTEGA FERRUSOLA C, SALAZAR-SANDOVAL C, MORILLO RODRÍGUEZ A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H, TAPIA JA, MORCUENDE D, PEÑA JA. Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 46: 141-148.

MADISON J, EVANS LE, YOUNGS CR. The effect of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. *Journal of equine Veterinary*. 2013; 33: 272-278.

MEDEIROS A, GOMES G, CARMO M, PAPA F, ALVARENGA M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 2002; 58(2):273-276.

MESA AM. Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos. Trabajo de grado Magister Ciencias-Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. 2010; 11-13.

MOORE AI, SQUIRES EL, GRAHAM JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2005; 63:2372-81.

MORILLO-RODRIGUEZ A, DA SILVA CB, MACIAS GARCIA B, GALLARDO BOLAÑOS JM, TAPIA JA, APARICIO IM. Dimethylformamide improves in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. *Reproduction Domestic Animals*. 2012; 47: 995-1002.

MORILLO-RODRIGUEZ A, ORTEGA FERRULOSA C, MACIAS-GARCIA B, MORREL JM, RODRIGUEZ MARTINEZ H, TAPIA JA, PEÑA FJ. Freezing stallion semen with caceres extender improves post-thaw sperm quality and diminishes stallion to stallion variability. *Animal reproduction science*. 2011; 127(1-2):78-83.

MORILLO-RODRIGUEZ A. Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Departamento de medicina animal. Universidad de Extremadura. 2013.

MORREL JM, PIHL J, DALIN AM, JOHANNISSON A. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. *Theriogenology*. 2012; 78: 345-352.

MUNJUNATH P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction Science*. 2012; 9(4):809-815.

NEILD D, CHAVES G, FLORES M, MORA N, BECONI M, AGIIERO A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 1999; 51: 721-727.

NOURI H, TOWHIDI A, ZHANDI M, SADEGHI R. The effects of centrifugated egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze Caspian horse semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2013; 33: 1050-1053.

OLIVEIRA RR, RATES DM, PUGLIESI G, KER PG, ARRUDA RP, MORAES EA, CARVALHO GR. Use of Cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen Cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. *Reproduction Domestic Animal*. 2014; 49: 845-850.

ORTEGA-FERRUSOLA C, GARCÍA B, GALLARDO-BOLAÑOS J, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ L, RODRÍGUEZ-MARTINEZ H, TAPIA J, et al. Apoptotic markers can be used to forecast the freeze ability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2009; 114(4):393–403.

ORTIZ I , DORADO J , RAMÍREZ L , MORRELL JM , ACHA D, URBANO M, GÁLVEZ MJ, CARRASCO JJ , GÓMEZ-ARRONES V, CALERO-CARRETERO R, HIDALGO M. Effect of single layer centrifugation using Androcoll-E-Large on the sperm quality parameters of cooled-stored donkey semen doses. *Animal*. 2014; 8(2): 308-315.

PACE MM, GRAHAM EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing, *Journal Animal Science*. 1974; 39: 1119–1144.

PEREZ-OSORIO J, MELLO F, JULIANI G, LAGARES M, LAGO L, HENRY M. Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction*. 2008; 3/4 (5): 103-109.

PILLET E, DUCHAMP G, BATELLIER F, BEAUMAL V, ANTON M, DESHERCES S, SCHMITT E, MAGISTRINI M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 2011; 75:105-114.

RESTREPO G, GÓMEZ J, VÁSQUEZ N. Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida. *Revista la Sallista de Investigación*. 2012; 8(2): 9-17.

ROTA A, PANZINI D, SABATINI C, CAMILLO F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*. 2012; (78):1846-1854.

SANTOS GF. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5 °C. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.1994; 82.

SQUIRES EL, KEITH SL, GRAHAM JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2004; 62(6):1056-65.

VILES-LÓPEZ K. Estudio de la inflamación endometrial post inseminación con semen congelado de burro. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 2013.

WARREN L. Feeding the stallion. Alberta Agriculture and Rural Development. Alberta, USA, 2009.