

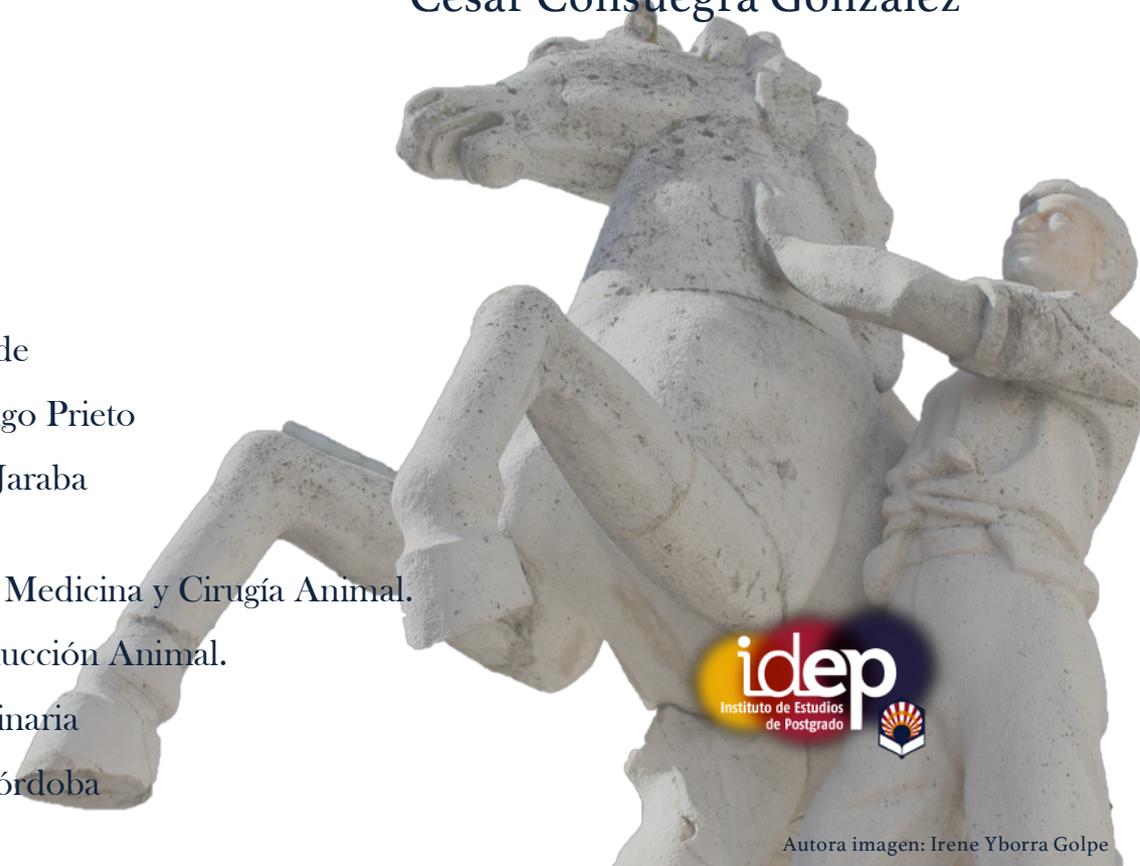
Vitrificación de esperma de caballo empleando crioprotectores no penetrantes

*Vitrification of stallion sperm using nonpermeating
cryoprotectants*

César Consuegra González

Bajo la dirección de
Dr. Manuel Hidalgo Prieto
Dra. Isabel Ortiz Jaraba

Departamento de Medicina y Cirugía Animal.
Grupo de Reproducción Animal.
Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba



Autora imagen: Irene Yborra Golpe

INFORME DEL DIRECTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

MANUEL HIDALGO PRIETO E ISABEL ORTIZ JARABA, DEPARTAMENTO DE
MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL, UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

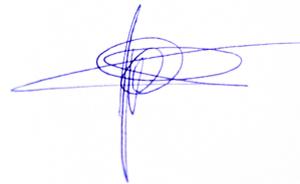
INFORMAN:

Que el trabajo presentado por D. César Consuegra González, Con NIF 26504714C, bajo el Título “Vitrificación de espermatozoides de caballo empleando crioprotectores no penetrantes” reúne los requisitos para su lectura y defensa, estando adaptado en contenido, profundidad y duración a la asignación de créditos ECTS del Plan de Estudios del Título de Máster en Medicina, Sanidad y Mejora Animal de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, a 30 de junio de 2017



Fdo.: Manuel Hidalgo Prieto



Fdo.: Isabel Ortiz Jaraba

Los directores del Trabajo Fin de Máster

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Summary	5
3. Introducción	6
4. Materiales y métodos	9
4.1. Recogida de espermatozoides y evaluación.....	9
4.2. Congelación convencional y descongelación.....	9
4.3. Vitrificación de espermatozoides	10
4.4. Evaluación post-vitrificación del espermatozoides.....	11
4.4.1. Volumen eyaculado	11
4.4.2. Concentración espermática.....	11
4.4.3. Análisis automático del movimiento espermático.....	11
4.4.4. Integridad de la membrana plasmática	12
4.4.5. Integridad de la membrana acrosomal.....	12
4.5. Diseño experimental.....	13
4.6. Análisis estadístico	14
5. Resultados	15
5.1. Experimento 1: Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de BSA para vitrificación de espermatozoides de caballo a diferentes temperaturas.	15
5.2. Experimento 2: Comparación entre congelación lenta convencional y vitrificación	18
6. Discusión	19
7. Conclusiones	23
8. Agradecimientos	24
9. Bibliografía	25

1. Resumen

La vitrificación de espermatozoides es un método reciente de criopreservación, basado en la bajada de temperatura a alta velocidad introduciendo el espermatozoides directamente en nitrógeno líquido, reduciendo la formación de grandes cristales de hielo, como ocurre en la congelación lenta tradicional. El objetivo de este estudio es valorar la vitrificación de espermatozoides equinos empleando crioprotectores no penetrantes como alternativa a la congelación lenta con glicerol. Para ello, se valoraron diferentes concentraciones de sacarosa y albúmina sérica bovina (BSA) en vitrificación de espermatozoides equinos (experimento 1). Posteriormente, se comparó la vitrificación con la congelación lenta tradicional de espermatozoides de caballo (experimento 2). Para ello se recogieron un total de 33 eyaculados de 6 caballos mediante vagina artificial tipo Missouri. Los eyaculados libres de gel tras la recogida fueron analizadas para los parámetros volumen, concentración, movimiento total, progresivo e integridad de la membrana plasmática. Tras el proceso de vitrificación, se analizaron los parámetros movimiento total, progresivo, integridad de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal (experimento 2). En el experimento 1 se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa: 0,02; 0,05; 0,1 moles/litro (molaridad, M) y de BSA: 1 %; 5 %; 10 % para vitrificación. En el experimento 2, se comparó la congelación lenta empleando glicerol (2,2 %) o sacarosa (0,02 M; 0,1 M) y 1 % BSA, con la vitrificación utilizando sacarosa (0,02 M) y de BSA (1%) por separado y en combinación. En el experimento 1, los resultados demostraron que las concentraciones de 0,02M de sacarosa y 1% de BSA presentaban valores superiores significativamente para el movimiento espermático y la integridad de la membrana plasmática ($P < 0,05$); además la combinación de 0,02 M de sacarosa y 1% de BSA obtuvo resultados mayores significativamente ($P < 0,05$) para el movimiento total ($55,67 \pm 2,99$ % vs. $35,41 \pm 2,96$ %) progresivo ($38,32 \pm 3,05$ % vs. $14,42 \pm 1,80$ %) e integridad de la membrana plasmática ($66,61 \pm 2,69$ % vs. $49,16 \pm 2,60$ %) que la congelación convencional. Por tanto concluimos que la vitrificación de espermatozoides equinos empleando crioprotectores no penetrantes es una alternativa a la congelación lenta convencional.

Palabras clave: vitrificación; espermatozoides; caballo; sacarosa.

2. Summary

Vitrification of sperm is a new method of cryopreservation based on high speed freezing by direct exposure of sperm to liquid nitrogen, reducing the formation of big ice crystals. The aim of this study was to evaluate the effect of vitrification of equine sperm using sucrose and bovine serum albumin (BSA) as an alternative to slow freezing with glycerol. For this purpose, different concentrations of sucrose and BSA were compared for equine sperm's vitrification (experiment 1). After that, vitrification of equine sperm was compared with traditional slow freezing (experiment 2). To achieve this objective 33 ejaculates were collected from 6 stallions using a Missouri-model artificial vagina. Gel-free semen samples were analyzed for the sperm parameters volume, concentration, motility and integrity of sperm membrane. After vitrification-warming process, motility, integrity of sperm membrane and acrosomal membrane (experiment 2) were evaluated. In experiment 1, different concentration of sucrose: 0.02; 0.05; 0.1 mole/litre (molarity, M) and BSA: 1 %; 5 %; 10 %, were used for vitrification. In experiment 2, we compared slow freezing using glycerol (2.2 %) or sucrose (0.02 M; 0.1 M) adding 1 % BSA, with vitrification using sucrose (0.02 M) and BSA (1 %) separately or combined. The results showed that 0.02 M sucrose and 1% BSA present the highest values for sperm motility and plasma membrane integrity ($P<0.05$); moreover, 0.02M sucrose and 1% BSA combined, obtained higher values ($P<0.05$) than conventional freezing, for the parameters total motility (55.67 ± 2.99 % vs. 35.41 ± 2.96 %), progressive (38.32 ± 3.05 % vs. 14.42 ± 1.80 %) and plasma membrane integrity (66.61 ± 2.69 % vs. $49.16 \pm 2,60$ %) with significant differences ($P<0.05$). We can therefore conclude that vitrification of equine sperm using non-permeable cryoprotectants could be an alternative to conventional slow freezing.

Keywords: Vitrification; spermatozoa; stallion; sucrose.

3. Introducción

La criopreservación de espermatozoides equinos se ha realizado tradicionalmente mediante métodos de congelación lenta, con el uso de crioprotectores penetrantes (Wu y col., 2015), siendo el glicerol el más utilizado en los últimos 50 años para la congelación de espermatozoides equinos (Hoffmann y col., 2011).

La congelación convencional implica la formación y disolución de cristales de hielo durante la congelación y descongelación. Si la bajada de temperatura es lenta, predomina la formación de hielo extracelular, exponiéndose a un medio hiperosmótico; si el enfriamiento es rápido, se forman cristales de hielo intracelulares (Mazur 1984, Morris y col., 2007). Sin embargo, recientemente se ha observado que no se forman cristales de hielo intracelulares en el espermatozoide del caballo, en los rangos de temperatura en los que se produce la congelación convencional (Morris y col., 2007, Pena y col., 2011). Por tanto, el daño en el espermatozoide se produce principalmente por el estrés osmótico que sufre durante la congelación-descongelación. En la congelación, el espermatozoide se encuentra en un medio hipertónico, lo que conlleva a su deshidratación, ya que pierde agua intracelular para mantener el equilibrio osmótico. En la descongelación se produce el proceso inverso, el espermatozoide se expone a condiciones hipotónicas, produciéndose el aumento de volumen de los espermatozoides por la entrada de agua al citoplasma, dañando la membrana plasmática (Peña y col., 2003, Pena y col., 2011, Macías García y col., 2012, Oldenhof y col., 2013). La integridad de la membrana plasmática es imprescindible para la funcionalidad del espermatozoide ya que tiene un papel fundamental en el metabolismo espermático, y por tanto en la fecundación, participando en la capacitación y reacción acrosómica. Además la habilidad del espermatozoide para sobrevivir a temperaturas bajas depende igualmente de la permeabilidad de la membrana plasmática (Oldenhof y col., 2012).

Por tanto, para reducir el daño producido durante la congelación de los espermatozoides, se emplean crioprotectores. Se trata de soluciones que protegen al espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación, debiendo tener una presión osmótica adecuada para minimizar el daño en la membrana plasmática. Sin embargo, la toxicidad de algunos crioprotectores puede ser el factor limitante para el éxito de la criopreservación (Fahy y col., 1990, Fahy 2010). Los crioprotectores penetrantes

ejercen su efecto tóxico desde el inicio del proceso de equilibrado (refrigeración), especialmente en el caso del glicerol, ya que penetra la membrana plasmática del espermatozoide más despacio que otros crioprotectores, provocando un mayor desequilibrio osmótico (Morris y col., 2007, Vidament y col., 2009). Además, encontramos daños por la toxicidad intrínseca del glicerol, ya que afecta a la actina del citoesqueleto, comprometiendo la capacidad del espermatozoide para hacer frente al estrés osmótico (Macias Garcia y col., 2012).

Por otra parte, al inseminar con espermatozoide congelado con glicerol, se ha observado un posible efecto irritante en el tracto reproductor de los équidos, inflamándose las paredes de cuerpo y cuernos uterinos, además de producirse un acumulo de líquido en el cuerpo uterino, si bien los resultados de experiencias previas son contradictorios (Vidament y col., 2009), se ha visto que la inflamación aguda que ocurre de forma fisiológica tras la inseminación es independiente del diluyente crioprotector empleado (Katila 2012).

La vitrificación supone un método alternativo a la criopreservación convencional que permite que la solución pase a un estado vítreo, evitando el daño de la congelación tradicional (Fahy y col., 1984). Este procedimiento se basa en la congelación a alta velocidad, $2 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ C°/min (Fahy and Wowk 2015), donde los procesos de solidificación ocurren sin formación de cristales de hielo (Fahy y col., 1984). Para ello, se emplean altas concentraciones de crioprotectores que ayudan a aumentar la viscosidad del medio (Morris y col., 2006), obteniendo buenos resultados en la vitrificación de embriones y ovocitos (Rall and Fahy 1985). Sin embargo, al emplear esta tecnología para la criopreservación de espermatozoide no se obtienen buenos resultados debido a la baja tolerancia de estas células a la alta concentración de crioprotectores (Isachenko y col., 2003). Recientemente, se ha conseguido la vitrificación de espermatozoide humano, tomando pequeños volúmenes e introduciéndolos directamente en nitrógeno líquido sin ningún crioprotector penetrante (Isachenko y col., 2008). Se ha denominado vitrificación cinética debido a la bajada de temperatura ultrarrápida que promueve la solidificación vítrea del espermatozoide (Pradiee y col., 2015). La vitrificación cinética ha sido empleada con éxito para espermatozoide humano (Isachenko y col., 2004) y también para espermatozoide de otros animales como el perro (Sanchez y col., 2011), asno (M Diaz-Jimenez 2017), pez (Merino y col., 2012) y muflón (Pradiee y col., 2015). Para la vitrificación se emplean medios que combinan sacarosa y proteínas como crioprotectores no penetrantes, en lugar de los crioprotectores penetrantes tradicionales, principalmente el glicerol (Isachenko y col., 2012). Esta técnica al ser simple y económica resulta interesante para la congelación de espermatozoide en laboratorios o incluso

en condiciones de campo (Pradiee y col., 2015). Sin embargo, en la bibliografía reciente se encuentra poca información acerca de la aplicación de este método, particularmente en algunas especies animales, no encontrando información sobre vitrificación exitosa en esperma de caballo.

En el presente estudio tenemos como finalidad valorar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de albúmina sérica bovina (BSA) para la vitrificación de esperma de caballo como alternativa a la congelación lenta empleando glicerol. De manera operativa se marcaron los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar un diluyente a base de sacarosa y BSA para vitrificación de esperma de caballo, con o sin refrigeración previa, comparando para ello el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de BSA en los parámetros espermáticos tras la congelación-descongelación.
2. Comparar los parámetros espermáticos a la descongelación entre el método de vitrificación empleando un diluyente a base de sacarosa y BSA con la congelación convencional a base de glicerol.

4. Materiales y métodos

4.1. Recogida de esperma y evaluación

Las muestras de esperma se obtuvieron de seis sementales de raza Pura Raza Español (3), Hispano-árabe (1), Anglo-árabe (1) y Bretón (1) (entre 6 y 15 años) y clínicamente sanos, utilizando una vagina artificial tipo Missouri en presencia de una yegua en celo. Se realizaron dos recogidas semanales de cada animal, obteniendo un total de 33 eyaculados (de 2 a 4 eyaculados por animal). Todas las muestras de semen tenían al menos un volumen libre de gel de > 20 mL, concentración $> 146 \times 10^6$ espermatozoides/mL, movimiento total $> 76,6\%$, movimiento progresivo $> 49,9 \%$, valorados como se describe en el apartado *Análisis automático de movimiento espermático*. Los eyaculados fueron congelados o vitrificados como se detalla a continuación.

4.2. Congelación convencional y descongelación.

Para la congelación convencional (experimento 2), las muestras de semen fueron congeladas siguiendo un protocolo estándar para caballos con ligeras modificaciones (Sieme y col., 2008). Brevemente, el esperma fresco fue diluido al 1:1 (v:v) con INRA 96 (IMV-Technologies, L'Aigle Francia) y centrifugado durante 10 minutos a $600 \times g$. El pellet de espermatozoides fue resuspendido en el diluyente comercial INRA 96, con 2,2 % de glicerol, hasta alcanzar una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. El esperma fue refrigerado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (con descenso paulatino de la temperatura, $0,3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) durante 1 hora, siendo a continuación envasado en pajuelas de plástico de 0,5 mL. Las pajuelas fueron congeladas horizontalmente en un rack a 2,5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido (LN_2) durante 5 minutos. Posteriormente, se introdujeron en un tanque de LN_2 , donde se mantuvieron hasta su valoración. Las pajuelas fueron descongeladas mediante inmersión en un baño maría a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 segundos.

4.3. Vitrificación de espermatozoides

Para la vitrificación en el experimento 1 y 2, el espermatozoides fresco fue procesado tal como se indica en la congelación convencional. Tras la centrifugación, el pellet de espermatozoides fue resuspendido en diferentes medios para vitrificación.

Para el primer experimento los medios empleados fueron:

Experimento 1	
Tratamiento	Descripción
C	INRA 96
S20	0,02 M Sacarosa en INRA 96
S50	0,05 M Sacarosa en INRA 96
S100	0,1 M Sacarosa en INRA 96
BSA1	1 % BSA en INRA 96
BSA5	5 % BSA en INRA 96
BSA10	10 % BSA en INRA 96

En el segundo experimento se emplearon para vitrificación los siguientes medios:

Experimento 2	
Tratamiento	Descripción
S20 + BSA1	0,02 M Sacarosa + 1 % BSA en INRA 96
S20	0,02 M Sacarosa en INRA 96
BSA1	1 % BSA en INRA 96

Al resuspender el pellet en dichos medios, se obtuvo una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. El espermatozoides se vitrificó a temperatura ambiente (22 °C) o tras 1 hora de refrigeración a 5 °C (con descenso paulatino de la temperatura). A continuación, se tomaron 5 alícuotas de 30 μ L del espermatozoides diluido en los distintos medios y se introdujeron directamente en nitrógeno líquido (LN₂) y se almacenaron en criotubos en el interior de un tanque de LN₂. Las esferas se desvitrificaron sumergiéndolas una por una en un tubo Falcon con 2 mL de INRA a 42 °C, centrifugando la suspensión durante 10 minutos a 600 x g, y resuspendiendo el sedimento de espermatozoides en INRA96 hasta una concentración de 50×10^6 espermatozoides/mL.

4.4. Evaluación del esperma

4.4.1. Volumen eyaculado

El volumen del eyaculado se determina al finalizar la recogida, de forma visual, observando la escala graduada en mililitros del colector. En este caso, al colocar un filtro en el colector, obtenemos el volumen libre de gel (Vol, ml).

4.4.2. Concentración espermática

La concentración espermática fue valorada en el eyaculado mediante un espectrofotómetro calibrado para esperma de équidos (Spermacue®, Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Para ello, se toma una muestra del eyaculado con una pipeta Pasteur, y se introduce en una microcubeta destinada para ese fin y proporcionada por el fabricante. El resultado se mide en millones de espermatozoides por ml de esperma ($C \times 10^6/\text{ml}$).

4.4.3. Análisis automático del movimiento espermático

El movimiento espermático se valoró mediante un sistema de análisis automático de esperma, Sperm Class Analyzer (SCA v5.4.0.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain). Este sistema consiste en un microscopio óptico de contraste de fases (Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japón), una placa térmica a 37 °C (OK 51-512, Osaka, Digifred SL, Barcelona, España) y una cámara digital de alta velocidad (A312fc, Basler™ AG, Ahrensburg, Alemania) que captura en cada campo un total de 25 imágenes digitalizadas consecutivas por segundo, y un PC (Intel® Core™ i3 CPU, Intel Labs, Barcelona, España) para analizar los datos guardados. La configuración del SCA fue la siguiente: el tamaño de la célula 15-75 μm^2 ; espermatozoide progresivo con > 75% de coeficiente de rectitud (STR). Una alícuota de esperma fue diluida en INRA96 (IMV-Technologies, L'Aigle Francia) para obtener una concentración de 25×10^6 espermatozoides/mL, e incubada a 38 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se toman 5 μL del esperma diluido y se colocan en una cámara Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel). Se evaluaron de 2 gotas de 5 μL , tomando 6 campos de forma aleatoria, incluyendo un mínimo de 200 espermatozoides. La trayectoria de cada espermatozoide fue analizada con el software de SCA obteniendo los parámetros cinéticos espermáticos siguientes: movimiento total (MT, %) y progresivo (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) y media (VAP, $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN, $\text{VSL/VCL} \times 100$, %), rectitud (STR, $\text{VSL/VAP} \times 100$, %), oscilación

(WOB, VAP/VCL x 100, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batido del flagelo (BCF, Hz).

4.4.4. Integridad de la membrana plasmática

La integridad de la membrana plasmática fue valorada mediante el kit comercial Vital-Test® (Halotech DNA, S.L., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica determina la viabilidad de los espermatozoides en base a la integridad de su membrana plasmática, mediante la tinción de yoduro de propidio (PI) y naranja de acridina (AO). Para ello, se coloca en un portaobjetos una alícuota de 10 μl de esperma diluido a 25×10^6 espermatozoides/mL, añadiendo posteriormente AO y PI. Posteriormente se visualizan al menos 200 espermatozoides utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX- 40, Olympus U-RLF-T, Tokio, Japón) y el filtro U-ND25-2 (filtro de excitación de 469 a 490 nm) a 400x aumentos. De acuerdo con la Figura 1, observamos espermatozoides verdes (con membrana plasmática íntegra, el yoduro de propidio no puede penetrarla, solo entra el naranja de acridina uniéndose al ADN) y espermatozoides rojos (el yoduro de propidio atraviesa la membrana plasmática dañada, desplazando al naranja de acridina de su unión al ADN).

Se registró el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra (MPI, %).

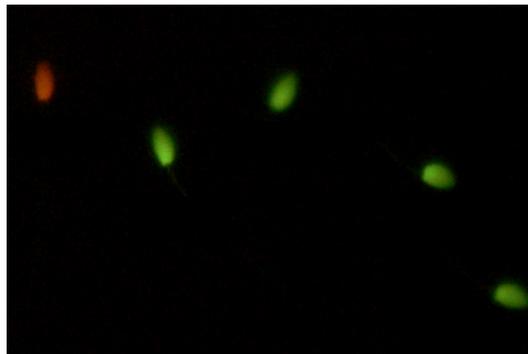


Figura 1. Espermatozoides bajo fluorescencia, teñidos con naranja de acridina (membrana plasmática íntegra) y yoduro de propidio (membrana plasmática dañada)

4.4.5. Integridad de la membrana acrosomal

La integridad de la membrana acrosomal fue valorada utilizando sobre una preparación previamente permeabilizada con etanol (70 %) la doble tinción de PI/PNA

(“peanut agglutinin-fluorescein isothiocyanate; FITC-PNA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) tal como fue descrita por Cheng y col., (1996) con ligeras modificaciones. Al menos 200 espermatozoides fueron evaluados en cada preparación usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX- 40, Olympus U-RLF-T, Tokio, Japón) y el filtro U-ND25-2 (filtro de excitación de 469 a 490 nm) a 1000x aumentos.

Los espermatozoides se clasificaron en tres grupos (Figura 2): membrana acrosomal íntegra, (AIS, la región acrosomal muestra fluorescencia verde; PI+/FICT-PNA+), membrana acrosomal activada (ARS, fluorescencia verde discontinua en zona acrosomal, o fluorescencia verde en segmento ecuatorial indicando la vesiculación y rotura de la membrana acrosomal; PI+/FICT-PNA±); y membrana acrosomal desnuda (ADS, o pérdida de la región acrosomal; PI+/FICT-PNA-). Los valores se expresaron en porcentaje (AIS; ARS; ADS %).

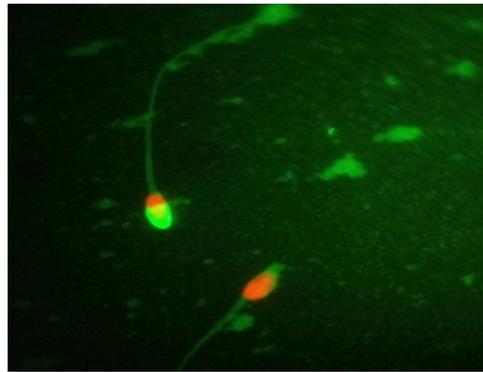


Figura 2. Espermatozoides bajo fluorescencia, teñidos con la doble tinción de PI/PNA.

Espermatozoide con región acrosomal verde intenso: acrosoma intacto. Espermatozoide solo con fluorescencia roja: acrosoma desnudo.

4.5. Diseño experimental

Experimento 1: Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de BSA para vitrificación de esperma de caballo a diferentes temperaturas.

Se emplearon 15 eyaculados de 6 animales para este experimento. Tras procesar el esperma, se empleó el medio INRA 96 como control y añadiendo sacarosa a las siguientes concentraciones 0,02 M (S20), 0,05 M (S50), 0,1 M (S100); o BSA hasta la concentración final de 1 % (BSA1), 5 % (BSA5) y 10 % (BSA10). Las suspensiones fueron vitrificadas

inmediatamente tras estar 10 minutos a temperatura de laboratorio (22 °C) o después de 1 hora de refrigeración (5 °C). Los parámetros espermáticos de movimiento espermático y la integridad de la membrana plasmática fueron analizados tras la desvitrificación tal como se describieron anteriormente, comparando los resultados obtenidos entre sacarosa o BSA a temperatura de laboratorio (22 °C) o tras refrigeración (5 °C).

Experimento 2: Comparación entre congelación lenta convencional y vitrificación.

Un total de 18 eyaculados de 6 caballos fueron usados en el experimento 2. A partir de los resultados del experimento 1, se seleccionaron las concentraciones de sacarosa 20 M y 1 % de BSA, además de la combinación de ambos crioprotectores (S20 + BSA1); éstos se compararon con la congelación convencional con glicerol (GLY), analizando para este fin los parámetros espermáticos movimiento espermático, integridad de la membrana plasmática y acrosomal tras la desvitrificación y descongelación.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error típico de la media. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas empleando un modelo general lineal (GLM) y la prueba post-hoc Duncan, con animales, eyaculados y tratamientos como factores fijos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SAS v9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El nivel de significación se estableció en $P < 0,05$.

5. Resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos en la valoración previa a la congelación, todos los eyaculados presentaron características espermáticas incluidas dentro de los rangos considerados fisiológicos para caballos fértiles: Volumen (mL): $48,42 \pm 4,15$; Concentración ($\times 10^6/\text{ml}$): $294,94 \pm 18,64$; Movimiento Total (%): $91,44 \pm 2,09$; Movimiento Progresivo (%): $70,33 \pm 2,64$; Integridad Membrana Plasmática (%): $94,45 \pm 1,44$.

5.1. Experimento 1: Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de BSA para vitrificación de esperma de caballo a diferentes temperaturas.

Los resultados de los parámetros espermáticos obtenidos en la valoración del esperma tras su vitrificación (previa refrigeración o a temperatura de laboratorio) y descongelación, comparando diferentes concentraciones de sacarosa se muestran en la Tabla 2, mientras que para las diferentes concentraciones de BSA se presentan en la Tabla 3.

En la tabla 2 observamos que los valores obtenidos con S20 (0,02 M) tras refrigeración ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) son significativamente mayores para los parámetros espermáticos MT, MP, MPI, VCL, VSL y VAP ($P < 0,05$) comparado con el resto de tratamientos.

En la tabla 3 observamos que los valores obtenidos con BSA1 (1 % BSA) tras refrigeración ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) son mayores para los parámetros espermáticos MT, MP, MPI y BCF comparado con el resto de tratamientos. No hay diferencias significativas entre BSA1 y BSA5 para los parámetros MT, MP, MPI, ALH y LIN.

Tabla 2. Resultados de los parámetros espermáticos valorados tras la descongelación de los eyaculados de los caballos (N=6) comparando diferentes concentraciones de sacarosa.

Parámetro	22 °C				5 °C			
	INRA 96	S20	S50	S100	INRA 96	S20	S50	S100
MT	37,36 ± 3,14 ^{ab}	36,03 ± 2,51 ^{ab}	34,58 ± 2,16 ^b	41,54 ± 3,51 ^{ab}	38,51 ± 2,88 ^{ab}	46,85 ± 4,10 ^a	45,13 ± 3,80 ^{ab}	42,70 ± 3,77 ^{ab}
MP	18,53 ± 3,16 ^b	20,51 ± 2,16 ^b	19,74 ± 2,06 ^b	22,82 ± 2,16 ^b	21,19 ± 2,70 ^b	32,92 ± 4,10 ^a	25,26 ± 2,78 ^{ab}	26,68 ± 3,21 ^{ab}
MPI	52,67 ± 2,83 ^{ab}	48,99 ± 2,22 ^b	50,42 ± 4,10 ^{ab}	48,86 ± 3,97 ^b	55,46 ± 2,43 ^{ab}	60,83 ± 2,62 ^a	59,04 ± 2,13 ^{ab}	57,99 ± 3,54 ^{ab}
VCL	50,57 ± 5,44 ^b	61,04 ± 4,51 ^{ab}	57,93 ± 4,19 ^{ab}	56,13 ± 3,01 ^{ab}	51,15 ± 5,01 ^b	67,55 ± 3,57 ^a	62,62 ± 4,09 ^{ab}	66,15 ± 4,27 ^a
VSL	33,74 ± 3,66 ^{ab}	37,51 ± 3,19 ^{ab}	37,33 ± 3,60 ^{ab}	34,68 ± 2,87 ^{ab}	28,63 ± 3,57 ^b	40,07 ± 2,97 ^a	33,21 ± 3,23 ^{ab}	38,27 ± 2,95 ^{ab}
VAP	37,65 ± 3,75 ^{ab}	41,88 ± 3,41 ^{ab}	41,73 ± 3,91 ^{ab}	38,85 ± 2,60 ^{ab}	32,82 ± 3,91 ^b	45,88 ± 3,26 ^a	37,13 ± 4,21 ^{ab}	44,29 ± 3,31 ^{ab}
ALH	2,22 ± 0,26 ^a	2,62 ± 0,24 ^a	2,48 ± 0,17 ^a	2,83 ± 0,26 ^a	2,46 ± 0,17 ^a	2,71 ± 0,12 ^a	2,46 ± 0,22 ^a	2,75 ± 0,25 ^a
LIN	59,34 ± 3,79 ^a	60,33 ± 3,79 ^a	63,69 ± 2,64 ^a	61,13 ± 2,68 ^a	54,47 ± 3,36 ^a	59,33 ± 3,01 ^a	53,05 ± 4,86 ^a	57,50 ± 3,33 ^a
STR	87,18 ± 2,81 ^a	88,53 ± 1,91 ^a	89,14 ± 0,96 ^a	87,06 ± 4,03 ^a	86,12 ± 1,54 ^a	87,18 ± 1,25 ^a	80,63 ± 5,24 ^a	85,39 ± 2,36 ^a
BCF	10,24 ± 0,83 ^a	9,97 ± 0,59 ^a	10,27 ± 0,69 ^a	10,03 ± 0,79 ^a	9,87 ± 0,59 ^a	10,88 ± 0,52 ^a	10,02 ± 0,83 ^a	11,17 ± 0,47 ^a

INRA 96= Diluyente control INRA96; S20= Sacarosa 0,02 M; S50= Sacarosa 0,05 M; S100= Sacarosa 0,1 M; MT= Movimiento Total; MP=Movimiento Progresivo; MPI= Membrana plasmática íntegra; VCL=Velocidad curvilínea; VSL=Velocidad rectilínea; VAP=Velocidad media; ALH=Amplitud desplazamiento lateral de la cabeza; LIN=Linealidad; STR=Rectitud; BCF=Frecuencia del batido del flagelo. Los valores están expresados en media± error típico. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Tabla 3. Resultados de los parámetros espermáticos valorados tras la descongelación de los eyaculados de los caballos (N=6) comparando diferentes concentraciones de BSA.

Parámetro	22 °C				5 °C			
	INRA	BSA1	BSA5	BSA10	INRA	BSA1	BSA5	BSA10
MT	37,36 ± 3,14 ^{ab}	31,53 ± 3,93 ^{bc}	28,93 ± 3,67 ^{bc}	20,73 ± 3,45 ^c	38,51 ± 2,88 ^{ab}	45,81 ± 2,65 ^a	44,01 ± 2,26 ^a	35,92 ± 3,66 ^{ab}
MP	18,53 ± 3,16 ^{bc}	16,47 ± 3,04 ^{bc}	13,32 ± 2,77 ^{bc}	12,27 ± 2,19 ^c	21,19 ± 2,70 ^{abc}	30,16 ± 2,62 ^a	29,18 ± 2,99 ^a	21,93 ± 2,87 ^{ab}
MPI	52,67 ± 2,83 ^{ab}	42,52 ± 3,76 ^{bc}	39,18 ± 3,87 ^c	36,62 ± 3,19 ^c	55,46 ± 2,43 ^a	57,18 ± 2,74 ^a	55,33 ± 2,51 ^a	46,98 ± 3,38 ^{abc}
VCL	50,57 ± 5,44 ^c	62,95 ± 7,74 ^{abc}	52,78 ± 7,59 ^c	58,80 ± 8,14 ^{bc}	51,15 ± 5,01 ^c	76,78 ± 4,38 ^{ab}	82,97 ± 7,06 ^a	68,84 ± 7,62 ^{abc}
VSL	33,74 ± 3,66 ^{bc}	33,43 ± 4,55 ^{bc}	29,68 ± 4,98 ^c	34,37 ± 4,52 ^{bc}	28,63 ± 3,57 ^c	44,54 ± 3,11 ^{ab}	52,62 ± 4,52 ^a	41,04 ± 4,99 ^{abc}
VAP	37,65 ± 3,75 ^{ab}	43,65 ± 5,94 ^{ab}	37,73 ± 5,83 ^{ab}	43,88 ± 5,71 ^{ab}	32,82 ± 3,92 ^b	53,91 ± 3,86 ^{ab}	110,81 ± 49,6 ^a	51,44 ± 6,03 ^{ab}
ALH	2,22 ± 0,26 ^{ab}	2,27 ± 0,39 ^{ab}	1,75 ± 0,32 ^b	1,76 ± 0,32 ^b	2,46 ± 0,17 ^{ab}	2,85 ± 0,17 ^a	3,05 ± 0,35 ^a	2,67 ± 0,42 ^{ab}
LIN	59,34 ± 3,79 ^a	49,23 ± 5,92 ^a	47,65 ± 6,72 ^a	54,67 ± 7,18 ^a	54,47 ± 3,36 ^a	58,35 ± 2,49 ^a	62,75 ± 2,73 ^a	53,56 ± 5,93 ^a
STR	87,13 ± 2,81 ^a	74,65 ± 5,11 ^{ab}	66,95 ± 7,63 ^{ab}	63,69 ± 9,18 ^b	86,12 ± 1,54 ^a	83,10 ± 1,73 ^{ab}	84,15 ± 1,74 ^{ab}	71,77 ± 6,86 ^b
BCF	10,24 ± 0,83 ^{ab}	7,05 ± 0,99 ^{bc}	5,55 ± 0,92 ^c	6,05 ± 1,07 ^c	9,87 ± 0,59 ^{ab}	10,32 ± 0,43 ^a	8,56 ± 0,73 ^{abc}	7,58 ± 1,04 ^{abc}

INRA 96= Diluyente control INRA96; **BSA1**=1 % Albúmina Sérica Bovina; **BSA5**=5 % Albúmina Sérica Bovina; **BSA10**= 10 % Albúmina Sérica Bovina; **MT**= Movimiento Total; **MP**=Movimiento Progresivo; **MPI**= Membrana plasmática íntegra; **VCL**=Velocidad curvilínea; **VSL**=Velocidad rectilínea; **VAP**=Velocidad media; **ALH**=Amplitud desplazamiento lateral de la cabeza; **LIN**=Linealidad; **STR**=Rectitud; **BCF**=Frecuencia del batido del flagelo. Los valores están expresados en media± error típico. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P<0,05$).

5.2. Experimento 2: Comparación entre congelación lenta convencional y vitrificación

De acuerdo con los resultados del experimento anterior, se seleccionaron las concentraciones de sacarosa 0,02 M (S20) y 1 % BSA (BSA1) para la vitrificación de espermatozoides de caballo, y se comparó con la congelación lenta convencional con glicerol (Tabla 4). Se encontraron valores significativamente superiores con el diluyente S20+BSA1 para los parámetros TM, PM, MPI, VAP y ALH ($P > 0,05$), no habiendo diferencias significativas con S20 respecto al parámetro AIS y LIN, y con BSA1 respecto al parámetro VCL, VSL. El diluyente GLY obtuvo valores mayores significativamente para ARS y ADS ($P < 0,05$).

Tabla 4. Resultados de los parámetros espermáticos valorados tras la descongelación de los eyaculados de los caballos (N=6) tras congelación convencional o vitrificación.

Parámetro	Congelación Lenta		Vitrificación	
	GLY	S20+BSA1	S20	BSA1
TM	35,411 ± 2,96 ^c	55,67 ± 2,99 ^a	45,62 ± 3,01 ^b	42,83 ± 2,66 ^b
PM	14,42 ± 1,80 ^c	38,32 ± 3,05 ^a	25,99 ± 1,89 ^b	28,17 ± 2,71 ^b
MPI	49,16 ± 2,60 ^c	66,61 ± 2,69 ^a	58,51 ± 2,84 ^b	57,28 ± 2,39 ^b
AIS	14,91 ± 1,57 ^c	49,19 ± 2,60 ^a	45,33 ± 3,20 ^a	37,87 ± 2,92 ^b
ARS	50,03 ± 1,36 ^a	30,43 ± 2,15 ^c	33,77 ± 1,62 ^c	38,71 ± 2,15 ^b
ADS	35,06 ± 1,64 ^a	20,38 ± 2,17 ^b	20,90 ± 3,07 ^b	23,42 ± 2,59 ^b
VCL	43,87 ± 2,2 ^b	79,41 ± 5,69 ^a	71,53 ± 7,77 ^a	69,67 ± 3,59 ^a
VSL	24,92 ± 2,06 ^c	47,27 ± 3,74 ^a	39,19 ± 2,60 ^b	45,28 ± 2,97 ^a
VAP	28,87 ± 2,08 ^c	57,47 ± 4,46 ^a	46,50 ± 3,82 ^b	51,86 ± 3,31 ^{ab}
ALH	2,32 ± 0,09 ^b	2,96 ± 0,16 ^a	2,69 ± 0,14 ^{ab}	2,69 ± 0,15 ^{ab}
LIN	55,59 ± 2,74 ^b	60,59 ± 3,25 ^{ab}	60,19 ± 2,66 ^{ab}	65,02 ± 2,06 ^a
STR	84,95 ± 1,56 ^a	83,41 ± 3,03 ^a	85,43 ± 2,45 ^a	87,94 ± 1,32 ^a
BCF	10,04 ± 0,65 ^a	9,89 ± 0,312 ^a	10,67 ± 0,35 ^a	9,61 ± 0,44 ^a

GLY= Diluyente control congelación convencional glicerol 2,2% en INRA96; S20+BSA1= Sacarosa 0,02M + 1 % Albúmina Sérica Bovina; S20= Sacarosa 0,02 M; BSA1= 1 % Albúmina Sérica Bovina; MT= Movimiento Total; MP=Movimiento Progresivo; MPI= Membrana plasmática íntegra; VCL=Velocidad curvilínea; VSL=Velocidad rectilínea; VAP=Velocidad media; ALH=Amplitud desplazamiento lateral de la cabeza; LIN=Linealidad; STR=Rectitud; BCF=Frecuencia del batido del flagelo. Los valores están expresados en media ± error típico. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

6. Discusión

En este estudio, la vitrificación de esperma de caballo ha sido realizada con éxito usando pequeños volúmenes y empleando un medio diluyente a base de sacarosa y BSA, pudiendo ser una alternativa a la congelación convencional de esperma equino.

En el primer experimento, se compararon distintas concentraciones de sacarosa y de BSA así como la refrigeración o no refrigeración previa para la vitrificación de esperma equino. De las concentraciones valoradas de sacarosa, el tratamiento S20 (sacarosa 0,02 M) tras refrigeración (5 °C) presentó los mayores valores significativamente para movimiento total, progresivo, integridad de la membrana plasmática y los cinéticos VCL, VSL y VAP. Por otra parte, el tratamiento BSA1 (1 % BSA) tras refrigeración (5°C) obtuvo los mayores valores para el movimiento total, progresivo e integridad de la membrana plasmática.

En ambas comparativas, la vitrificación realizada tras refrigeración (5 °C) previa permite obtener mayores valores en todos los parámetros. La refrigeración previa a la congelación tradicional se ha realizado rutinariamente al demostrarse que se obtienen valores superiores en movimiento total y progresivo tras la descongelación (Crockett y col., 2001, Backman y col., 2004). Sin embargo, el esperma de caballo es sensible al shock por frío, siendo crítica la bajada de temperatura de 19 a 8 °C si esta disminución de temperatura es rápida (Moran y col., 1992). Para la vitrificación de esperma de algunas especies se han encontrado mejores resultados si se vitrificaba sin refrigeración previa, (Isachenko y col., 2008, Sanchez y col., 2011, Schulz y col., 2017) aunque en el caso del muflón, se procedió a refrigerar el esperma durante 1 hora a 5 °C al igual que en el presente trabajo, obteniéndose así mejores resultados (Pradiee y col., 2015). Esto puede ser debido a que a temperaturas de refrigeración (22-0°C) se reduce la lisis de espermatozoides que se produce al encontrarse en un medio hiperosmótico (Gao y col., 1993).

Por otra parte, podemos observar que los mejores resultados se han obtenido con las concentraciones más bajas de ambos crioprotectores, tanto sacarosa como BSA. Esto se puede explicar debido a que para que la vitrificación sea exitosa se necesita una gran velocidad de enfriamiento o bien una alta concentración de solutos (Fahy and Wowk 2015); en el presente trabajo al utilizarse alícuotas de bajo volumen, 30 µL, se consigue

una alta velocidad de enfriamiento, y por tanto se necesitarían menores concentraciones de crioprotectores. Por otra parte, la nucleación de cristales de hielo y el crecimiento de éstos en la vitrificación dependen del tipo de solución; si ésta contiene azúcares (sacarosa), estos desplazan el agua y proporcionan una mayor viscosidad en la solución, dificultando la formación y crecimiento de cristales de hielo (Fahy and Wowk 2015). La BSA protege al ADN del espermatozoide, por su efecto antioxidante al eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y por proteger al espermatozoide del choque térmico manteniendo la integridad de la membrana plasmática (Uysal y col., 2005). En algunos parámetros (MT, MP, MPI, ALH y LIN) no se encontraron diferencias significativas entre 1 % y 5 % de BSA. Puede ser debido a que hasta el 5 % la BSA ejerce su efecto beneficioso, pero al aumentar hasta el 10 %, el espermatozoide se encuentra en un medio hiperosmótico, sufriendo el espermatozoide el estrés osmótico (Nang y col., 2012).

En la bibliografía, encontramos estudios previos en los que se ha empleado la sacarosa para la vitrificación de espermatozoide de hombre, de perro (Sanchez y col., 2011), de muflón (Pradiee y col., 2015) y recientemente de burro (M Diaz-Jimenez 2017).

En cuanto a la selección de las molaridades de sacarosa y BSA empleadas, es resultado del trabajo previo realizado en nuestro laboratorio donde se estudió un rango amplio de concentraciones de ambos crioprotectores tomando como referencia las utilizadas en diferentes investigaciones encontradas en la bibliografía consultada. Una vez realizada esta evaluación, se seleccionaron aquellas concentraciones cuyos valores de los parámetros espermáticos eran máximos. Las molaridades que fueron seleccionadas finalmente fueron 0,02 M, 0,05 M, 0,1 M de sacarosa, y 1 %, 5 % y 10 % de BSA.

En estudios realizados en vitrificación de espermatozoide humano, se concluyó que la concentración de sacarosa que mejores porcentajes de motilidad daba tras la descongelación era 0,2 M dando resultados similares a los obtenidos con la congelación convencionales (Zhu 2012). Resultados similares se obtuvieron en vitrificación con espermatozoide canino, encontrando que la concentración que mejores resultados daba era 0,25 M y BSA (albúmina sérica bovina) al 1 % (Sanchez y col., 2011). En el muflón se encontraron los mejores resultados con 0,1 M de sacarosa más 6 % de yema de huevo (Pradiee y col., 2015). Por último, en burros se ha conseguido la vitrificación exitosa de espermatozoide empleando 0,25 M de sacarosa y 1 % de BSA (M Diaz-Jimenez 2017).

Se observan diferencias en cuanto a la selección de la molaridad de sacarosa entre especies debido a variaciones fisiológicas entre ellas, ya que para humano, perro y burro

se necesitan molaridades similares de sacarosa, mientras que para muflón una molaridad inferior obtuvo mejores resultados.

En este estudio, se han conseguido mejores resultados con 0,02 M de sacarosa frente a molaridades superiores (0,05 M y 0,1 M); esta molaridad es claramente inferior a las empleadas en otras especies. Puede deberse a que el esperma de caballo sea susceptible a mayores molaridades de sacarosa para la vitrificación, como ocurre en el caso del muflón; en la vitrificación de esperma de muflón se observó que a medida que aumentaba la molaridad de sacarosa se producía un descenso en el movimiento y la integridad de la membrana plasmática, lo cual indica una mayor susceptibilidad a altas molaridades de sacarosa (Pradiee y col., 2015).

Por otra parte, encontramos que la concentración de BSA con la que se obtienen los mejores resultados es 1 % de BSA. En un estudio de congelación de esperma de peces (Shaluei y col., 2017) se valoraron diferentes concentraciones de BSA: 0,25 %, 0,5 % y 1 % , observando que mejoraba significativamente el movimiento con la adición de 1 % de BSA. En otro estudio en cabras, se valoraron también diferentes concentraciones encontrando que los mejores resultados se obtenían con 1 % y 1,5 % de BSA (Salazar y col., 2008, Naijian y col., 2013). En los estudios de vitrificación de esperma de perro y burro (Sanchez y col., 2011, M Diaz-Jimenez 2017) también se combina sacarosa con 1% de BSA, obteniendo los mejores resultados. Podemos pensar que esa concentración de BSA es suficiente para ejercer su efecto antioxidante eliminando las especies reactivas de oxígeno, así como manteniendo la integridad de la membrana plasmática al inhibir la peroxidación lipídica (Cabrita y col., 2001, Uysal y col., 2005), sin llegar a aumentar la osmolaridad del medio en exceso y provocar estrés osmótico.

En el segundo experimento, se comparó la vitrificación con la congelación convencional con un crioprotector penetrante, el glicerol (GLY). Para ello, se seleccionaron las concentraciones de sacarosa 0,02 M (S20) y 1 % BSA (BSA1) de acuerdo con los resultados del experimento anterior. Se quiso estudiar el efecto de estos crioprotectores con las concentraciones seleccionadas tanto de forma aislada, S20 y BSA1, como en combinación (S20+BSA1).

Según los resultados obtenidos, la combinación de ambos crioprotectores no penetrantes obtuvo los mayores valores en el movimiento y la integridad de la membrana plasmática, así como en algunos parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP y ALH). Igualmente, los tres tratamientos para vitrificación obtuvieron mejores resultados que la congelación convencional con glicerol.

En cuanto a la integridad de la membrana acrosomal (AIS), no se encontraron diferencias significativas entre S20 + 1 % BSA y S20. Lo cual nos indica que la protección de la membrana acrosomal es debida en mayor medida a la acción de la sacarosa.

Además el diluyente GLY obtuvo valores mayores significativamente para membrana acrosomal activada (ARS) y desnuda (ADS), lo cual indica una menor protección de la membrana acrosomal con este crioprotector. El efecto tóxico de los crioprotectores penetrantes se debe al estrés osmótico que se produce tanto al penetrar en la célula, como al salir de ésta en la descongelación. Se produce un daño físico-químico en las membranas plasmáticas e intracelulares debido a los cambios en la fase de transición de los lípidos de membrana y al aumento de peroxidación de los lípidos. (Mossad y col., 1994) Por lo tanto, un daño significativamente superior de la membrana acrosomal es esperable con el uso de crioprotectores penetrantes.

En el presente trabajo se han obtenido valores inesperadamente elevados en movimiento, integridad de la membrana plasmática y acrosomal en la vitrificación de espermatozoides empleando diluyentes sin crioprotector penetrante. En estudios previos de vitrificación, se obtuvieron valores muy bajos de movimiento, llegando incluso a ser inmóviles (Jiménez-Rabadán y col., 2015) (Pradice y col., 2015) (Jiménez-Rabadán y col., 2015, Arando y col., 2017). Igualmente, los valores para la congelación convencional han sido inferiores a los esperados (Mantovani y col., 2002).

El diluyente que se ha empleado (INRA 96) ha sido utilizado previamente en la congelación de espermatozoides de caballo, añadiendo crioprotectores, antioxidantes, yema de huevo, entre otros (Chen y col., 1993) (Salazar y col., 2008). En este estudio para comparar ambos métodos de criopreservación, se ha empleado el mismo medio diluyente simplemente reemplazando el glicerol de la congelación convencional por sacarosa y BSA en la vitrificación. En un estudio previo en el que se empleó para la congelación convencional INRA 96 añadiendo solo glicerol los resultados fueron igualmente inesperadamente bajos para el movimiento (Alvarez y col., 2014). Probablemente, si se hubiera usado un diluyente formulado para congelación se habrían obtenido mejores resultados en la congelación convencional, aunque cabe esperar que esta mejora se hubiese observado igualmente en la vitrificación.

Por lo tanto, se podrían realizar futuros estudios en los que se evalúe el efecto de otros agentes que han demostrado previamente su utilidad en la congelación convencional, esperando obtener mejores resultados en la vitrificación.

Los resultados obtenidos en la vitrificación empleando sacarosa y BSA son similares a los obtenidos en estudios previos de congelación convencional para espermatozoides de caballo, empleando diferentes medios (Medeiros y col., 2002) (Scherzer y col., 2009) (Wu y col., 2015). En el trabajo de Scherzer empleando un 2 % de glicerol se consiguió un movimiento progresivo del 45,6 %, algo superior a nuestros resultados (38,32 %) . Sin embargo, en el artículo de Medeiros, se obtuvo un movimiento progresivo del 16 %, claramente inferior a los resultados del presente trabajo de vitrificación con sacarosa y BSA. Igualmente en el estudio de Wu el uso glicerol (2,5 %) de forma aislada resultó en un movimiento progresivo del 23% y una integridad de la membrana plasmática del 27,26 %; es destacable la diferencia existente en cuanto a la integridad de la membrana plasmática con nuestro trabajo (66,61 %). La acción protectora de la sacarosa sobre la membrana plasmática ya fue observada en estudios previos de vitrificación (Isachenko y col., 2012, Pradiee y col., 2015). Esta protección es posible gracias al aumento de la viscosidad del medio que ocasiona la sacarosa, dificultando la formación y crecimiento de cristales de hielo y por tanto el daño en la membrana plasmática (Fahy and Wolk 2015)

7. Conclusiones

Conforme a los objetivos propuestos y los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

- La vitrificación de espermatozoides equinos obtuvo los mayores valores para el movimiento total, progresivo y la integridad de la membrana plasmática tras la refrigeración previa del espermatozoides empleando los diluyentes con 0,02 M de sacarosa y 1 % de BSA.
- El diluyente para vitrificación con 0,02 M de sacarosa y BSA 1 % presentó valores significativamente superiores en los parámetros espermáticos de movimiento total, progresivo, integridad de la membrana plasmática y los parámetros cinéticos VAP y ALH en comparación con la congelación convencional a base de glicerol. Por tanto, la vitrificación de espermatozoides de caballo empleando esta concentración de sacarosa y BSA podría ser una alternativa a la congelación convencional.

8. Agradecimientos

Al Centro Militar de Cría Caballar de Ávila (Ávila, Castilla y León) por ceder la instalaciones y sementales para la realización del presente trabajo, así como a los encargados del centro por su ayuda y colaboración. César Consuegra González ha disfrutado de una Beca Semillero de Investigación de la Universidad de Córdoba en el curso 2016/2017. Este trabajo ha sido soportado por el proyecto AGL-2013-42726-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

9. Bibliografía

- Alvarez, C., L. Gil, N. Gonzalez, M. Olaciregui and V. Luno (2014). "Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96(R) extender." *Cryobiology* 69(1): 144-148.
- Arando, A., A. Gonzalez, J. V. Delgado, F. A. Arrebola and C. C. Perez-Marín (2017). "Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification." *Anim. Reprod. Sci.* 181: 175-185.
- Backman, T., J. E. Bruemmer, J. K. Graham and E. L. Squires (2004). "Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen." *Journal of Animal Science* 82(3): 690-694.
- Cabrita, E., L. Anel and M. P. Herraéz (2001). "Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm." *Theriogenology* 56(4): 623-635.
- Chen, Y., R. H. Foote and C. C. Brackett (1993). "Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm." *Cryobiology* 30(4): 423-431.
- Cheng, F. P., A. Fazeli, W. F. Voorhout, A. Marks, M. M. Bevers and B. Colenbrander (1996). "Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa." *Journal of Andrology* 17(6): 674-682.
- Crockett, E. C., J. K. Graham, J. E. Bruemmer and E. L. Squires (2001). "Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: Preliminary results." *Theriogenology* 55(3): 793-803.

- Fahy, G. M. (2010). "Cryoprotectant toxicity neutralization." *Cryobiology* 60(3 Suppl): S45-53.
- Fahy, G. M., T. H. Lilley, H. Linsdell, M. S. J. Douglas and H. T. Meryman (1990). "Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms." *Cryobiology* 27(3): 247-268.
- Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell and H. T. Meryman (1984). "Vitrification as an approach to cryopreservation." *Cryobiology* 21(4): 407-426.
- Fahy, G. M. and B. Wowk (2015). Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol, Humana Press Inc.* 1257: 21-82.
- Gao, D. Y., E. Ashworth, P. F. Watson, F. W. Kleinhans, P. Mazur and J. K. Critser (1993). "Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis." *Biology of Reproduction* 49(1): 112-123.
- Hoffmann, N., H. Oldenhof, C. Morandini, K. Rohn and H. Sieme (2011). "Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing." *Anim Reprod Sci* 125(1-4): 112-118.
- Isachenko, E., V. Isachenko, Katkov, II, S. Dessole and F. Nawroth (2003). "Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success." *Reprod Biomed Online* 6(2): 191-200.
- Isachenko, E., V. Isachenko, J. M. Weiss, R. Kreienberg, Katkov, II, M. Schulz, A. G. Lulat, M. J. Risopatron and R. Sanchez (2008). "Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose." *Reproduction* 136(2): 167-173.
- Isachenko, V., E. Isachenko, Katkov, II, M. Montag, S. Dessole, F. Nawroth and H. Van Der Ven (2004). "Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability." *Biology of Reproduction* 71(4): 1167-1173.

- Isachenko, V., E. Isachenko, A. M. Petrunkina and R. Sanchez (2012). "Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies." *Reprod. Fertil. Dev.* 24(2): 323-326.
- Jiménez-Rabadán, P., O. García-Álvarez, A. Vidal, A. Maroto-Morales, M. Iniesta-Cuerda, M. Ramón, E. del Olmo, R. Fernández-Santos, J. J. Garde and A. J. Soler (2015). "Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders." *Cryobiology* 71(1): 85-90.
- Katila, T. (2012). "Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus." *Reproduction in Domestic Animals* 47(SUPPL. 5): 31-41.
- M Diaz-Jimenez, B. P., I Ortiz, C Consuegra, A.Partyka, J Dorado, and M Hidalgo (2017). "Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws." In press.
- Macias Garcia, B., C. Ortega Ferrusola, I. M. Aparicio, A. Miro-Moran, A. Morillo Rodriguez, J. M. Gallardo Bolanos, L. Gonzalez Fernandez, C. M. Balao da Silva, H. Rodriguez Martinez, J. A. Tapia and F. J. Pena (2012). "Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential." *Theriogenology* 77(7): 1280-1289.
- Mantovani, R., A. Rota, M. E. Falomo, L. Bailoni and L. Vincenti (2002). "Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test." *Reproduction Nutrition Development* 42(3): 217-226.
- Mazur, P. (1984). "Freezing of living cells: mechanisms and implications." *The American journal of physiology* 247(3 Pt 1): C125-142.

- Medeiros, A. S. L., G. M. Gomes, M. T. Carmo, F. O. Papa and M. A. Alvarenga (2002). "Cryopreservation of stallion sperm using different amides." *Theriogenology* 58(2-4): 273-276.
- Merino, O., R. Sanchez, J. Risopatron, E. Isachenko, Katkov, II, E. Figueroa, I. Valdebenito, P. Mallmann and V. Isachenko (2012). "Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report." *Andrologia* 44 Suppl 1: 390-395.
- Moran, D. M., D. J. Jasko, E. L. Squires and R. P. Amann (1992). "Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa." *Theriogenology* 38(6): 999-1012.
- Morris, G. J., K. Faszer, J. E. Green, D. Draper, B. W. Grout and F. Fonseca (2007). "Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation." *Theriogenology* 68(5): 804-812.
- Morris, G. J., M. Goodrich, E. Acton and F. Fonseca (2006). "The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation." *Cryobiology* 52(3): 323-334.
- Mossad, H., M. Morshedi, J. P. Toner and S. Oehninger (1994). "Impact of cryopreservation on spermatozoa from infertile men: Implications for artificial insemination." *Archives of Andrology* 33(1): 51-57.
- Naijian, H. R., H. Kohram, A. Z. Shahneh and M. Sharafi (2013). "Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process." *Small Rum. Res.* 113(2-3): 371-375.
- Nang, C. F., K. Osman, S. B. Budin, M. I. Ismail, F. H. Jaffar, S. F. Mohamad and S. F. Ibrahim (2012). "Bovine serum albumin: survival and osmolarity effect in bovine spermatozoa stored above freezing point." *Andrologia* 44 Suppl 1: 447-453.

- Oldenhof, H., K. Friedel, M. Akhoondi, M. Gojowsky, W. F. Wolkers and H. Sieme (2012). "Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability." *Mol Membr Biol* 29(3-4): 95-106.
- Oldenhof, H., M. Gojowsky, S. Wang, S. Henke, C. Yu, K. Rohn, W. F. Wolkers and H. Sieme (2013). "Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents." *Biol. Reprod.* 88(3): 68.
- Pena, F. J., B. M. Garcia, J. C. Samper, I. M. Aparicio, J. A. Tapia and C. O. Ferrusola (2011). "Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?" *Theriogenology* 76(7): 1177-1186.
- Peña, F. J., A. Johannisson, M. Wallgren and H. Rodríguez-Martínez (2003). "Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: A new method of evaluating sperm membrane integrity." *Theriogenology* 60(4): 677-689.
- Pradice, J., M. C. Estes, A. Lopez-Sebastián, A. Toledano-Díaz, C. Castaño, J. A. Carrizosa, B. Urrutia and J. Santiago-Moreno (2015). "Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa." *Theriogenology* 84(9): 1513-1522.
- Rall, W. F. and G. M. Fahy (1985). "Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification." *Nature* 313(6003): 573-575.
- Salazar, J. L., S. S. Hayden, J. A. Waite, K. L. Comerford, A. J. Edmond, S. R. Teague, C. C. Love and D. D. Varner (2008). "Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa." *Animal Reproduction Science* 107(3-4): 347-348.
- Sanchez, R., J. Risopatron, M. Schulz, J. Villegas, V. Isachenko, R. Kreinberg and E. Isachenko (2011). "Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function." *Andrologia* 43(4): 233-241.

- Scherzer, J., R. A. Fayrer-Hosken, M. Aceves, D. J. Hurley, L. E. Ray, L. Jones and G. L. Heusner (2009). "Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility." *Australian Veterinary Journal* 87(7): 275-279.
- Schulz, M., J. Risopatrón, G. Matus, E. Pineda, C. Rojas, V. Isachenko, E. Isachenko and R. Sánchez (2017). "Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm." *Andrologia* 49(9): e12757.
- Shaluei, F., A. Sadeghi and V. Zadmajid (2017). "Cryopreservation of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm: effects of cryoprotectants, antioxidant, membrane stabilizer, equilibration time and dilution ratio on sperm motility and fertility." *Aquaculture Research* 48(3): 1031-1040.
- Sieme, H., R. A. P. Harrison and A. M. Petrunkina (2008). "Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion." *Animal Reproduction Science* 107(3-4): 276-292.
- Uysal, O., T. Korkmaz and H. Tosun (2005). "Effect of bovine serum albumine on freezing of canine semen." *Indian Vet. J.* 82(1): 97-98.
- Vidament, M., P. Vincent, F. X. Martin, M. Magistrini and E. Blesbois (2009). "Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not." *Anim. Reprod. Sci.* 112(1-2): 22-35.
- Wu, Z., X. Zheng, Y. Luo, F. Huo, H. Dong, G. Zhang, W. Yu, F. Tian, L. He and J. Chen (2015). "Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants." *Anim. Reprod. Sci.* 163: 75-81.
- Zhu, J., Wu, L.M., Jin, R.T., Liu, Y.S., Guo, T.H. and Tong, X.H. (2012). "Ultrarapid cryopreservation of human spermatozoa with different concentrations of sucrose." *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology* 18(11): 1009-1013.

