



Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34). Edición continua

CAPSULAS BIODEGRADABLES E HIDROSOLUBLES COMO UNA ALTERNATIVA DE ENVASE DEL CONTENIDO SEMINAL DURANTE EL PROCESO DE CRIO-PRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO

Juan E. Sambache Tayupanta^{1*}, Juan F. Pérez Villafuerte¹

¹Universidad de las Américas UDLA. Vía a Nayon s/n. Campus UDLA PARK. Quito, Ecuador

*Dirección para correspondencia: juan.sambache@udla.edu.ec

Fecha de Recepción: 05-10-2021

Fecha de Aceptación: 06-12-2021

Fecha de Publicación: 31-01-2022

Resumen

El objetivo fue evaluar la utilización de cápsulas biodegradables e hidrosolubles, como una alternativa de envase del eyaculado durante el proceso de crío-preservación de semen, se evaluó la integridad de la cápsula y las características espermáticas post-descongelación del semen equino de 5 donantes de raza criolla. La extracción de semen se realizó mediante vagina artificial, se analizaron características como el color, el pH, la motilidad en masa, motilidad individual, morfología y concentración. Se realizó una dilución de 1 ml de semen con un 1 ml del diluyente y crío-preservante. Se utilizaron dos crío-preservantes (Triladyl® y Botucrío®) para determinar el efecto del crío-preservante sobre las características seminales post descongelación. Usando como base la técnica de empaquetamiento de pajuelas, con la adecuación del envasado del semen en cápsulas biodegradables como contenedor, se realizaron un total de 24 cápsulas de semen divididas en 2 tratamientos (12 cápsulas con dilución de Triladyl® y 12 cápsulas con dilución de Botucrío®) para someterlas a condiciones de congelación en gradientes de temperatura hasta llegar a -196 C°. Los indicadores evaluados fueron la calidad estructural de la cápsula y las características espermáticas post-descongelación. Se concluye que la utilización de cápsulas con polímeros biodegradables, es una alternativa eficaz como contenedor del eyaculado durante el proceso de crío-preservación, ya que se observa una adecuada integridad de la cápsula, sin deformación estructural, presenta un sellado hermético, mostrando resistencia al proceso. Se observó una ligera gelatinización del polímero de la cápsula (expansión) pero no se destruyen, lo que permite que las características seminales se mantengan intactas. La utilización del Botucrío® muestra ser eficaz, produce tasas de motilidad individual y en masa superiores al diluyente Triladyl®. Estas diferencias en la motilidad individual y masal de los espermatozoides, pueden ser atribuidos a efectos inherentes a la composición de las formulaciones de los diluyentes evaluados.

Palabras Clave: Equino criollo, Cápsula biodegradable, Crío-preservación, Espermatozoide.

IDs Orcid:

Juan E. Sambache Tayupanta: <https://orcid.org/0000-0002-9686-8351>

Juan F. Pérez Villafuerte: <https://orcid.org/0000-0002-8084-6350>

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crío-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

BIODEGRADABLE AND WATER-SOLUBLE CAPSULES AS AN ALTERNATIVE PACKAGING FOR SEMEN CONTENT DURING THE EQUINE SEMEN CRYOPRESERVATION PROCESS

Abstract

The objective was to evaluate the use of biodegradable and water-soluble capsules, as an alternative for packaging the ejaculate during the semen cryopreservation process. Were evaluated the integrity of the capsule and the post-thaw sperm characteristics of equine semen from 5 donors Creole breed. Semen extraction was performed using an artificial vagina, characteristics such as color, pH, mass motility, individual motility, morphology and concentration were analyzed. Was made a dilution of 1 ml of semen with 1 ml of the extender and cryopreservative. Two cryopreservatives (Triladyl® and Botucrío®) were used to determine the effect of the cryopreservative on post-thaw semen characteristics. Using the straw packaging technique as a basis, with the adaptation of semen packaging in biodegradable capsules as a container, were made a total of 24 semen capsules, divided into 2 treatments (12 capsules with Triladyl® dilution and 12 capsules with Triladyl® dilution). Botucrío®) to subject them to freezing conditions in temperature gradients until reaching $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. The indicators evaluated were the structural quality of the capsule and the post-thaw sperm characteristics. It is concluded that the use of capsules with biodegradable polymers is an effective alternative as a container for the ejaculate during the cryopreservation process, since an adequate integrity of the capsule is observed, without structural deformation, it presents a hermetic seal, showing resistance to process. A slight gelatinization of the capsule polymer (expansion) was observed but they were not destroyed, allowing the semen characteristics to remain intact. The use of Botucrío® shows to be effective, it produces individual and mass motility rates higher than the Triladyl® diluent. These differences in the individual and mass motility of the spermatozoa can be attributed to effects inherent to the composition of the formulations of the diluents evaluated.

Keywords: Creole equine, Biodegradable capsule, Cryo-preservation, Espermatozoide.

1. INTRODUCCIÓN

En términos generales, con semen congelado en equinos la fertilidad es menor en comparación con la observada en otras especies. Este fenómeno se debe a características propias de la especie y a que la selección del reproductor se hace de acuerdo a su rendimiento en las diferentes disciplinas ecuestres, más no en su capacidad reproductiva. (Clulow et al., 2007). Esto ha llevado a que los sementales sean catalogados como buenos o malos candidatos para que sus células germinales sean sometidas a proceso de congelación, con base en las características de su movilidad espermática pos-descongelación. (Hoffmann et al., 2007). El proceso de crio-preservación de semen radica en la congelación y conservación de las células germinales a descensos de temperaturas con objetivos reproductivos, siendo elemental para las prácticas de biotecnología de la reproducción. La criobiología ha experimentado los efectos de los descensos de temperaturas sobre las células germinales y su correlación con el tiempo de exposición, generando el conocimiento base para realizar los procesos de crio-preservación (Palacios, 1994). En el proceso de congelación de las células germinales se originan cambios en la organización y estructura de las membranas plasmáticas lo que afecta a las características seminales con tendencia a reducir su capacidad fecundante y de acuerdo a su resistencia se definirá los rangos de supervivencia. (Jiménez, 2011).

La inseminación artificial se ha visto limitada en la especie equina debido a que la crio-preservación del semen es uno de los principales problemas en los criadores ecuestres. Si se realiza el análisis del costo-beneficio de los programas de inseminación artificial, no se observan buenos resultados; esto podría deberse a la utilización de crio-preservantes para bovinos y otros rumiantes (Giraldo, 2006), así como también, el corto tiempo de vida del germoplasma lo que limita la aplicación de las distintas técnicas de reproducción asistida y por tanto el progreso genético (Restrepo, 2014). El problema mundial para acelerar los programas de mejora genética en equinos, es la adquisición de genomas deseables que contengan el material genético para la expresión de características productivas de caballos puros que buscan los criadores y a través de su utilización poder instaurar los programas de mejoramiento genético enfocadas en las razas criollas (Justac, 2017).

En el Ecuador el costo de compra-venta de genética es muy alto, ya sea por el valor económico que representa, el mérito genético del animal, carga genética o la aparición de ciertos rasgos de

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

interés productivo que los criadores buscan con el objetivo de potencializar su valor (Almeida, 2012). En el país, la utilización de las técnicas de reproducción asistida en la especie equina es limitada, concretamente no se ha realizado un programa para modificar los métodos tradicionales de contención espermática equina e inseminación artificial. Tampoco se han impulsado proyectos de investigación genética enfocado a rescatar el caballo criollo ecuatoriano y darle un realce manteniendo y mejorando sus caracteres fenotípicos y genotípicos de esta manera permitir al caballo ecuatoriano posicionarlo como una raza propia del país (Justac, 2017).

El planteamiento de esta investigación propone cambiar el medio de envasado convencional por un medio de envasado del semen en cápsulas biodegradables e hidrosolubles, determinar la eficacia de la cápsula de polímeros hidrosolubles como contenedor espermático y su resistencia al medio criogénico; de igual manera con el fin de evaluar el diluyente más adecuado para la especie equina, se propone utilizar dos crio-persevantes; uno exclusivo para equinos como es el Botucurio® de la empresa Botupharma USA y el Triladyl® de la empresa Minitube un diluyente comercial muy utilizado para la crio-conservación de semen y que muestra gran eficacia en varias especies animales.

Bajo este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilización de cápsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino. También se evaluó el efecto del crio-protector sobre los caracteres espermáticos pos descongelación del semen equino de razas criollas con embasamiento en cápsulas biodegradables e hidrosolubles.

2. METODOLOGÍA

2.1 Unidad experimental

Para el desarrollo de la investigación, se utilizó el semen fresco de 5 equinos donantes de raza criolla ecuatoriana con un rango de edad de 5 a 7 años de edad de propiedad de la Hacienda Pachanlica perteneciente al cantón Pelileo en la parroquia Salasaca en la provincia de Tungurahua, de los cuales se obtuvo una cantidad promedio de 20.6 ml de semen de cada donante. Las muestras de semen fueron analizadas y el ensayo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la reproducción Animal de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

2.2 Preparación de las cápsulas biodegradables

Se realizó la separación del almidón de yuca mediante el reposo del tubérculo en suspensión de agua y posteriormente fue filtrada por telas finas para atrapar el almidón. Mediante polimerización se logró obtener una estructura gelatinosa moldeable (Meneses et al., 2013), la misma que se colocó en un molde de cerámica positivo y negativo de cápsulas y tapas de 50 unidades por período. Se desmoldo un total de 200 cápsulas viables de acuerdo a su estructura y morfología. Después de una semana de reposo se solidifican en cápsulas semi-duras con propiedades hidrosolubles.

2.3 Recolección del semen

La colecta del semen se realizó con la ayuda de una yegua previamente sometida a un proceso de sincronización de celo, que ayudaría como estímulo para facilitar la monta de los sementales donantes de la muestra. Mediante la aplicación de la técnica de vagina artificial y posterior desviación del pene del donador, se realizó la extracción del semen. Luego del armado de la vagina artificial equina se dispuso al semental para la recolección del semen, se esperó el reflejo de monta del donante y se espera un lapso de 15 minutos hasta apreciar el reflejo del tercer golpe de contracción equina en el cual el macho libera aproximadamente 20.6 ml de semen. En el momento de la colecta, se retiró mediante un filtro estéril la fracción en gel del eyaculado que permita la obtención de la fracción rica en espermatozoides (Varner, 2008). Todos los materiales que se utilizaron para la extracción y procesamiento de la muestra seminal fueron atemperados previamente a 37 grados centígrados. El eyaculado resultante producto de la extracción fue sometido a un medio frío de 12 grados centígrados en condiciones de asepsia que permita mantener las características seminales intactas para ser transportados al laboratorio para su valoración y posterior procesamiento.

2.4 Valoración de la muestra obtenida

Se procedió a realizar una dilución de 1 ml de semen en 1 ml de diluyente dependiendo del tratamiento (Triladyl® y Botucurio®) como crio-conservantes. Para la valoración de la muestra en el laboratorio, ésta fue sometida a una temperatura de 37 grados centígrados mediante la exposición de la muestra en baño María. En un portaobjetos se colocó 500 ul de muestra seminal para valorar sus características macroscópicas y microscópicas previo al envasado en

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

cápsulas biodegradables y sometidas al proceso de congelación del semen. Las características microscópicas evaluadas fueron: Motilidad en Masa, motilidad individual, morfología del espermatozoide y concentración, como características macroscópicas se evaluó el color y el pH de la muestra. Con la utilización de la cámara de Neubauer mediante el conteo de cuadrantes, se realizó el cálculo para estimar el número de espermatozoides presentes en la muestra. Para determinar la concentración espermática de la muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{Esp.}{mm^3} = \frac{Ax Bx Cx E}{F}$$

donde:

Ax: Número de espermatozoides contados

Bx: Tamaño del cuadrado (400mm²)

Cx: Dilución Realizada 0.5 ml

D: Altura de la cámara (0.1mm)

E: Se multiplica por 10 para que el resultado quede expresado en 1mm³

F: Número de cuadrados contados

Fuente: (OMS, 1992)

2.5 Valoración del efecto del crio-preservante utilizado, en relación a la calidad de la muestra seminal envasada en cápsulas biodegradables

Para determinar el efecto del crio-preservante sobre la calidad seminal se prepararon 24 cápsulas de semen de las cuales 12 cápsulas contenían dilución seminal con Botucurio® y 12 cápsulas con dilución de semen con Triladyl® las mismas que fueron sometidas a procesos de crio-preservación. Después de 42 días post congelación se realizó la valoración de los dos diluyentes utilizados (Triladyl® y Botucurio®) para lo cual se procedió a la descongelación de las cápsulas de semen en baño María por 60 segundos a 37°C. Mediante un procedimiento modificado al reportado por Hidalgo²², se evaluaron los parámetros como el aspecto, el color, pH, motilidad en masa, motilidad individual, morfología y concentración. Se empleó un microscopio de contraste de fase con la adaptación de una Tablet con una cámara digital para facilitar su visualización. Para la valoración de la morfología y motilidad espermática se establecieron mediante la técnica modificada de eosina-nigrosina (Brito et al., 2011). En un portaobjetos atemperado a 37°C, se colocó una gota de semen con una gota de eosina-nigrosina; las gotas se fusionaron durante 30 a 60 segundos, y se realizó un extendido y la fijación del mismo con calor sobre una platina térmica. Se observó la morfología individual de los espermatozoides mediante microscopía (1000X). Los espermatozoides fueron clasificados

como morfológicamente normales o anormales (Brito et al., 2011). De igual manera, se clasificaron como vivos aquellos espermatozoides que no incorporaron el colorante y como muertos, aquellos que incorporaron el colorante.

2.6 Análisis estadístico

Mediante un modelo lineal generalizado (GLM) para cada variable dependiente como el pH, motilidad en masa, motilidad individual, morfología y concentración. Todas las variables a excepción de la variable dependiente, fueron incluidas en cada modelo como covariables. A continuación, se describe el modelo general empleado:

$$Y_{ijklmnopqr} = \mu + E_i + T_j + R_k + C_{lmnopqr} + e_{ijklmnopqr}$$

donde:

$Y_{ijklmnopqr}$ pH, motilidad en masa, motilidad individual, morfología y concentración del eyaculado del equino i , bajo el tratamiento j , en la repetición k , bajo las covariables l, m, n, o, p, q, r .

μ : Media para la característica.

E_i : Efecto fijo del eyaculado del equino (i).

T_j : Efecto fijo del tratamiento (j). (j = Triladyl® y Botucurio®).

R_k : Efecto fijo de la repetición (k). ($k=1 \dots 4$).

$C_{lmnopqr}$: Efecto fijo de las covariables (l, m, n, o, p, q, r).

$e_{ijklmnopqr}$: Error aleatorio.

Los resultados de cada tratamiento se compararon con la prueba de Tukey al 5%. Para determinar la asociación entre las variables evaluadas, se realizó un análisis de correlación de Pearson. Para todas las evaluaciones se utilizó el programa SAS 9.2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de instaurar el experimento se procedió a evaluar la integridad de la cápsula como medio de envase del contenido seminal y su resistencia durante el proceso de crio-preservación. También se valoró los crio-preservantes Botucurio® y Triladyl® como medios de dilución y crio-protectores para el semen equino y su efecto sobre las características seminales con la adecuación del medio de contención en capsulas biodegradables. Con el fin de determinar la

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

integridad y la viabilidad de la muestra seminal en la post-descongelación, se realizó la valoración de la muestra a los 42 días. Transcurrido el periodo de tiempo señalado se procedió a descongelar un número de 24 cápsulas para su valoración las mismas que fueron colocadas en tubos contenedores y sometidos a baño María para alcanzar una temperatura de 37 grados centígrados. A la muestra se le añadió 0.5 ml de diluyente (BotuTurbo®) con el fin de simular las condiciones vaginales finalmente el contenido seminal se extrajo mediante una pipeta. A través de microscopía se evaluaron las características microscópicas y con la utilización de la cámara *Neubauer* se realizó conteo y cálculo para la estimación del número de espermatozoides presentes en la muestra.

3.1 Evaluación del semen pre-congelación

Previo al proceso de crío preservación del semen se realizó la valoración de la muestra, la misma que presentó un aspecto acuoso propio del semen con un color blanco grisáceo, con un pH promedio de 6,9 el mismo que según Gómez (2013), debería estar en un promedio de 7.2 a 7.6. Mediante microscopía, en la muestra se observó una buena motilidad en masa (89.52%), una motilidad individual que presenta un 87.20% que representa un vigor de 5, en cuanto a la estructura del espermatozoide presentó una morfología del 89.52% considerada como normal (>80%) con una concentración de 800×10^6 Epz Mm³, Tabla 1.

Tabla 1. Valoración pre congelación del semen

Parámetro	Valoración
Aspecto	Acuoso
Color	Blanco Grisáceo
pH	6.9
Motilidad En Masa	89.52 = Muy Buena (80% – 90% Cmm)
Motilidad Individual	87.20 = Vigor 5 (MPRMR)
Morfología	89.52 = Normal >80%
Concentración	800×10^6 Epz Mm ³

*Se muestran las variables y sus valores de acuerdo a las medidas expresadas.

3.2 Envasado del *pellet* espermático en cápsulas biodegradables

Posterior a la valoración previa de las características macroscópica y microscópica del semen, se procedió a concentrar la carga espermática mediante centrifugación a 300 g por minuto durante ciclos de 2 minutos, con el objetivo de obtener el sedimento o *pellet* que constituye la fracción rica en espermatozoides. Finalizado el proceso de centrifugado se procedió a tomar la muestra sedimentada para llenar las cápsulas biodegradables en alícuotas de 0.65 ml de semen

y colocarlas en tubos de contención, los mismos que fueron expuestos en distintos gradientes de disminución de temperatura para adecuarlas a la temperatura de crio-preservación. Las cápsulas llenas de semen se sometieron a vapores de nitrógeno líquido por 15 min y a 6 cm de la superficie. Luego fueron sumergidas en nitrógeno líquido por 20 segundos. Una vez expuestas las cápsulas de semen a la temperatura de -196°C estas fueron colocadas en el tanque de nitrógeno líquido para su preservación.

3.3 Evaluación capsular pre-congelación

Las cápsulas elaboradas del almidón de yuca se adecuaron como contenedores llenos de semen, simulando el principio de una cápsula farmacéutica normal. Durante el proceso de empaquetamiento seminal las cápsulas presentaron una estructura uniforme y un sellado hermético, también se observó una ligera dilatación de la cápsula modificando su forma, pero sin descomponerse ni destruirse, estas características son ideales y son las que deben presentar los contenedores en la industria farmacéutica. Según Ceballos y De la Cruz (2007), este proceso se lo conoce como gelatinización del polímero en la cual sus moléculas se expanden, pero no se destruyen.

3.4 Evaluación capsular post-descongelación

Al retirar las cápsulas del medio de crio-preservación a los 42 días, se observó que las cápsulas habían sufrido un cambio en su forma semejante al proceso de deshidratación de una uva, pero sin perder su propiedad estructural y manteniendo las características de su composición y sellado hermético lo que permite que el contenido seminal se mantenga intacto, en perfecto estado de congelación, sin observar fugas en la cápsula y sin perder su capacidad aislante.

El estudio de modificaciones en el uso de nuevos contenedores seminales durante el proceso de empaquetado de semen equino propone una apertura para el desarrollo de la biotecnología de la reproducción enfocada en nuevas técnicas y procesos de la inseminación artificial en equinos, la misma que concuerda con lo propuesto por (Mesa, 2015), quien sostiene que la reproducción con semen congelado es una alternativa viable dependiendo de la técnica y el proceso de preparado del semen. El empaquetado de semen en cápsulas biodegradables e hidrosolubles dio un margen alto de viabilidad e integridad de la cápsula, pese al riesgo de ruptura que se esperaba de la misma, la cual no sufrió daños estructurales en la crio-

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

preservación y manteniendo intacto su contenido. (Jiménez, 2011), sostiene que la técnica tradicional de empaquetado de semen en pajuelas de 0.5 ml es la opción más recomendable debido a su fácil producción y transporte. No obstante la cápsula propuesta es de más fácil producción y de similar viabilidad lo que comprueba que la inclusión en nuevas técnicas o modificaciones de envasado puede dar como origen a nuevas ramas y aplicaciones reproductivas al alterar factores primordiales como la técnica de inseminación artificial tradicional y proponiendo incluso, protocolos inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) para futuras investigaciones en equinos o en diferentes especies, acotando a lo mencionado se puede aplicar dicha propuesta a diferentes especies manteniendo su estructura inicial y cambiando los métodos tradicionales de contenedores de semen durante el proceso de crio-preservación.

3.5 Valoración del efecto del crio-preservante utilizado en relación a la calidad de la muestra

Se halló un volumen de semen promedio (mL) de 20.6 ± 5.4 de los eyaculados recolectados de cada donante. Se evaluaron post-descongelación 24 cápsulas de semen en total. Los resultados de los modelos ajustados para los diferentes parámetros espermáticos evaluados se presentan en la tabla 2. Donde se observa que las muestras post-descongelación muestran un promedio del pH de 7.05, presentan una motilidad masal de 84.43%, con una motilidad individual de 76.66%, una morfología dentro de los rangos de normalidad ya que se observa que más del 80% de espermatozoides muestran integridad en la morfología espermática (82.34%) y una concentración de espermatozoides promedio 1000×10^6 Epz Mm³ $163. \pm 163.6$

Tabla 2. Resultados de los modelos ajustados para los parámetros espermáticos

Variable	Media	Coefficiente de variación	R ²	Efecto Significativo
pH.	7.05	0.15	0.95	T
Motilidad Masal	84.43	3.56	0.82	T. MI M. CT
Motilidad Individual	76.66	12.33	0.97	MM
Morfología	82.34	3.58	0.91	T. CT.
Concentración	1000x106	22.75	0.88	T. MM.

***R²**: Coeficiente de determinación del modelo ajustado. **T**: tratamiento. **M.M**: motilidad en masa. **M.I**: motilidad individual. **M**: morfología. **C.T**: concentración

En la tabla 3 se observan los resultados de la evaluación del semen fresco y su comparación de las muestras seminales crio-preservadas en cápsulas biodegradables para valorar el efecto de los dos crio-preservante utilizados en los tratamientos realizados. Al comparar el efecto de los dos diluyentes utilizados se puede observar que el Botucurio® como medio protector del semen

muestra diferencias significativas al comparar el efecto protector del diluyente Triladyl®, se puede observar una favorable supervivencia y resistencia espermática, donde la estructura del contenido seminal se mantuvo estable ya que el diluyente Botucrío® preservó la muestra seminal del choque térmico donde se observó una viabilidad prolongada del semen con un pH estable (7) a diferencia del tratamiento con Triladyl®, donde se observa un pH con tendencia al medio ácido (7.8). De igual manera se observó una menor capacidad de la motilidad tanto masal como individual a diferencia de las muestras crio-preservadas con el Botucrío® donde los rangos de motilidad son superiores, un efecto de superioridad numérica pero no estadística se observa al valorar la morfología donde se identificó un menor daño en la estructura del espermatozoide donde la acción del Botucrío® por su combinación de dos crio-protectores permite incrementar la supervivencia del espermatozoide manteniendo la muestra seminal en condiciones de estabilidad en comparación con los diluyentes que contienen glicerol (Triladyl®). Debido al proceso de centrifugación, al que fueron sometidos para su concentración, el color del eyaculado presenta una ligera variación por presencia del diluyente en la muestra, al valorar la concentración se observa un aumento con relación a los valores iniciales (semen fresco). Este incremento se registra por consecuencia del proceso de centrifugado al que fue sometido el eyaculado antes del proceso de empaquetamiento en cápsulas biodegradables y cuyo objetivo fue para formar el *pellet* espermático, este comportamiento se mantiene en los dos tratamientos lo que determina que no existe efecto del crio-preservante sobre la concentración y que no existió sesgo en la investigación ya que la cantidad de espermatozoides en la muestra fue equitativa para los dos tratamientos.

La disminución de la calidad seminal post-descongelación en relación al semen fresco ha sido descrita ampliamente en equinos por Salazar (2011). En los resultados de esta investigación se observa una reducción significativa al comparar el semen fresco con las muestras sometidas al proceso de crio-conservación en los caracteres espermáticos como la motilidad en masa, la motilidad individual y la morfología (Tabla 3). También se observan diferencias significativas al comparar el efecto de los dos diluyentes utilizados del Botucrío® y Triladyl® sobre las características antes mencionadas. No se observó efecto significativo de la crio preservación sobre la morfología y la concentración; sin embargo, autores como Brum (2008), han reportado diversas alteraciones de la morfología de espermatozoides equinos crio-preservados. Los

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

promedios encontrados de motilidad de semen fresco y crio-preservado en esta investigación son comparables a otros reportados por Lozano (2016), cuando realizó una evaluación similar de estas características con un sistema CASA.

Tabla 3. Resultados de la evaluación del semen fresco y semen crio preservado en relación a los tratamientos utilizados

Tratamiento	pH.	Motilidad En Masa	Motilidad Individual	Morfología	Concentración
Semen Fresco	6.9 ^a	89.52 ^a	82.70 ^a	89.52 ^a	800x106 ^a
Triladyl®	7.8 ^b	77.87 ^b	72.80 ^b	77.23 ^b	1000x106 ^b
Botucurio®	7.0 ^a	85.99 ^a	81.97 ^a	81.42 ^b	1000x106 ^b

*Letras diferentes denotan diferencia estadística ($P \leq 0.05$).

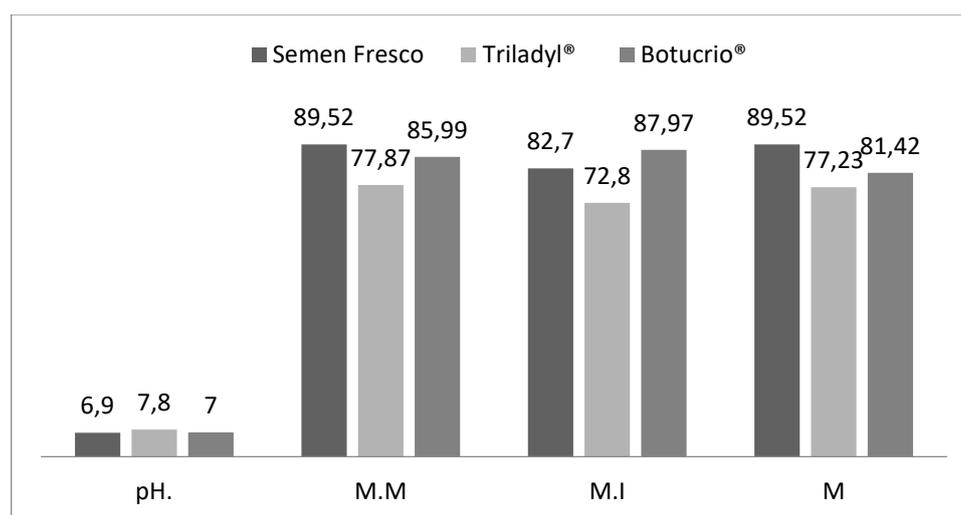


Figura 1. Evaluación de las características seminales: Motilidad en masa (M.,M); Motilidad Individual (M.I); Morfología (M) en semen fresco y semen congelado en relación al crio-preservante utilizado

El porcentaje de motilidad en masa post-descongelación fue superior para el diluyente Botucurio®, respecto al diluyente Triladyl®, el mismo comportamiento se observó para la variable motilidad individual (Tabla 3). Aunque estos diluyentes se han utilizado de forma frecuente en procesos de investigación, son escasos los antecedentes de comparación de los mismos para la crio-preservación de semen equino. Los crio-protectores constituyentes de los diluyentes empleados podrían, en parte, explicar los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la composición del Botucurio® y la formulación original del Triladyl® con glicerol. El Botucurio® como medio diluyente para la congelación de semen equino que combina glicerol-

metilformamida como crio-protector y 20 aminoácidos diferentes permitió determinar en la evaluación *in vitro* del semen congelado con Botucrio®, una favorable supervivencia y resistencia espermática, donde la estructura del contenido seminal se mantuvo estable, el diluyente preservó la muestra seminal del choque térmico ya que al valorar las características microscópicas se observó una viabilidad prolongada, motilidad espermática adecuada, extendiendo el tiempo de vida de los espermatozoides y con ciertas variante al estabilizar las muestras dentro de un pH de 7. Esta valoración concuerda con lo antes descrito por Samper⁶ donde atribuyen a la acción del Botucrio® por su combinación de dos crio-protectores, lo que permite que se incremente la supervivencia del espermatozoide en comparación con los diluyentes que contienen glicerol como único crio-protector por lo que se atribuye al efecto de la composición propia del Triladyl® las diferencias observadas en las variables analizadas. Sin embargo, hay que señalar que el crio-protector Triladyl® está recomendado y con excelentes resultados para la especie bovina y otros rumiantes lo que podría ser determinante en los resultados obtenidos.

También se observó una interesante asociación entre la motilidad en masa e individual y lo cual denota el papel determinante de la funcionalidad de la membrana plasmática en la capacidad de movimiento de los espermatozoides equinos, como lo describió Salazar (2011), que encontraron una correlación de $r=0.86$ entre la motilidad progresiva individual y en masa. (Mesa P., 2015) y sus colaboradores igualmente observaron superioridad de los crio-persevantes compuestos por más de un protector dentro de su composición, en comparación de los crio-protectores que contiene glicerol como único protector al valorar la movilidad del semen equino crio-preservado. Este estudio es importante y relativo para esta investigación, dado que para el estudio se tuvo en cuenta la inclusión de los mismos crio-protectores, donde se empleó el sistema SCA® para la evaluación de la motilidad del semen de caballos de la raza criollo colombiano, lo que corrobora los resultados obtenidos en esta investigación. No se observó ningún efecto significativo en la post-descongelación de los diluyentes utilizados sobre las características como la morfología y la concentración espermática (Tabla 3). Sería recomendable entonces evaluar el efecto de estos diluyentes sobre otras estructuras celulares y sobre diferentes procesos metabólicos del semen.

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

4. CONCLUSIONES

Luego de la investigación, se determina que la utilización de cápsulas de almidón de yuca con polímeros biodegradables, es una alternativa de contenedor del eyaculado durante el proceso de empaquetamiento y crio-preservación seminal, ya que se observa una adecuada integridad de la cápsula, sin deformación estructural, presenta un sellado hermético y muestra resistencia a las condiciones crio-génicas, también se observó una ligera gelatinización del polímero en la cual sus moléculas se expanden pero no se destruyen, lo que permite que las características seminales se mantengan intactas.

La estructura morfológica de la cápsula se mantuvo estable en condiciones de crio-preservación a temperaturas de -196°C durante las seis semanas de duración del experimento, lo que permite corroborar que los polímeros biodegradables son contenedores aceptables, ya que aseguran el aislamiento y la inocuidad del contenido interno de la cápsula; por lo tanto se convierte en una alternativa viable como contenedor de semen equino, ya que permite mantener intactas las características macroscópicas y microscópicas del semen diluido dentro de parámetros aceptables y sin perder la capacidad fecundante del semen.

La utilización del Botucio® como diluyente y crio-preservante, muestra ser eficaz, ya que produce tasas de motilidad individual y en masa superiores al observado con el diluyente Triladyl® en el semen descongelado de caballos de las razas criollas ecuatorianas. Estas diferencias en los indicadores de la motilidad individual y masal de los espermatozoides, pueden ser atribuidos a efectos inherentes de la composición de cada una de las formulaciones de los diluyentes utilizados y evaluados en esta investigación.

5. REFERENCIAS

- Almeida Sosa, M. R. (8 de Febrero de 2012). *Caracterización Zoométrica y Diagnostico de los Sistemas de Producción de Caballos Mestizos de Vaquería en el Cantón Rumiñahui* [Tesis de grado, Escuela superior Politécnica de Cotopaxi] Dspace. <http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/1285>
- American society for testing and materials. (2004). *Libro Anual de Normas ASTM*. <https://www.astm.org/BOOKSTORE/BOS/index.html>
- Baumber, J., & Ball, B. A. (2005). Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *American journal of veterinary research*, 66(8), 1415-1419. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1415>
- Brito, L. F., Barth, A. D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. L., & Kastelic, J. P. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, 60(8), 1539-1551. [https://doi.org/10.1016/S0093691X\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S0093691X(03)00174-2)

- Brito, L. F., Greene, L. M., Kelleman, A., Knobbe, M., & Turner, R. (2011). Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology*, 76(4), 745-750. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007>
- Brum, A. M., Sabeur, K., & Ball, B. A. (2008). Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69(9), 1041-1055. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.014>
- De la Cruz, G. A., & Ceballos, H. (2002). Taxonomía y morfología de la yuca. *Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT*. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/18089>
- Clulow, J. R., Maxwell, W. M. C., Evans, G., & Morris, L. H. A. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian veterinary journal*, 85(6), 232-235. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00151.x>
- Geocities. (2017). *Cápsula de gelatina rígida y blanda, capítulo III*. Geocities <https://www.geocities.ws/tecnofarma/capsulas.htm>
- Giraldo, N., Villegas, J. E. C., & Araque, N. V. (2006). Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(2), 8-16. <https://hdl.handle.net/10946/6615>
- Gómez, C. (2013). *Espermatozoides in vitro*. Invitrosperm. <http://invitrosperm.blogspot.com/2013/01/analisis-seminal-equino-y-bovino.html>
- Graham, J., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.006>
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., & Soler, C. (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinary Medicine – Czech Republic*, 50(1), 24-32. <http://www.agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2005/01/03.pdf>
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K., & Sieme, H. (2011). Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, 125(1-4), 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.001>
- Justac. (2017). *El caballo criollo*. Justac. http://www.justacriollo.com/pages_es/race_screoles_es/Rcpaso_peruano_es.htm
- Katila, T., Andersson, M., Reilas, T., & Koskinen, E. (2002). Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*, 58(2) 241-244. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20023124723>
- Loomis, P. R. (2006). Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.002>
- Lozano Benito, D., Gil Huerta, L., & Álvarez San Martín, C. (2011). Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanidad Militar*, 67(3), 284-290. <https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712011000400005>
- M.I. Jiménez, M. S. (2011). Seminología-2011-D-3-Técnicas de criopreservación seminal. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida*. <https://static.elsevier.es/congresos/congresomedre32.pdf>
- Meneses, J., Corrales, C. M., & Valencia, M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista EIA*, (8), 57-67. <http://ref.scielo.org/n239dq>

Artículo científico: Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino

Publicación Semestral. Vol. 1, No. 1, enero-junio 2022, Ecuador (p. 19-34)

- Mesa Guerra, P. F. (2015). Beneficios y ventajas de la inseminación artificial utilizando semen congelado en programas de reproducción en equinos. *Ciencia Unisall e*.
https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1088&context=medicina_veterinaria
- Muller, R. (1954). Técnicas de la explotación equina, tratado práctico de equinotécnica, normas consideraciones generales para la explotación del caballo de carrera y de trabajo. *Editorial Agro, Buenos Aires, Argentina*, 29-157. <https://www.sidalc.net/search/Record/oai:fvet.uba.ar:biblioteca:862>
- Neuhauser, S., Dörfel, S., & Handler, J. (2015). Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. *Andrology*, 3(3), 536-543. <https://doi.org/10.1111/andr.12003>
- OMS. (1992). *Manual de laboratorio de la OMS para exámenes del ser humano y la interacción entre semen y el moco cervical*. Editorial Médica Panamericana.
https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/39626/9500616092_spa.pdf
- Ospina, B. (2002). *La yuca en el tercer Milenio: Sistemas Modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. CIAT.
<https://books.google.es/books?id=I18Dz9sYZO8C&lpg=PR1&hl=es&pg=PR1#v=onepage&q&f=false>
- Palacios, A. (1994). Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Veterinaria México*, 25(3), 207-210. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23484>
- Perez-Osorio, J., Mello, F. G. C., Juliani, G. C., Lagares, M. A., Lago, L. A., & Henry, M. (2018). Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Animal Reproduction (AR)*, 5(3), 103-109. <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6076f7783717068b4797>
- Restrepo, G., Pizarro, E., & Rojano, B. A. (2019). Aporte antioxidante del plasma seminal y su efecto sobre la calidad del semen equino congelado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 276-287. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15699>
- Restrepo Betancur, G., Usuga Suarez, A., Montoya Páez, J. D., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de investigación*, 11(2), 63-70. <http://ref.scielo.org/yhydqc>
- Salazar Jr, J. L., Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, 76(3), 409-418. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.016>
- Samper, J., y García, A. (2008). *Reproducción Animal*. Journal of the American College of Radiology.
[http://www.jacr.org/article/S0378-4320\(08\)00312-6/abstract](http://www.jacr.org/article/S0378-4320(08)00312-6/abstract)