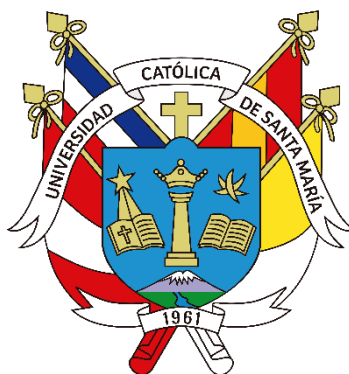


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**Comparación de agentes crioprotectores dimetilformamida y glicerol para
mejorar la funcionabilidad espermática de semen criopreservado de
caballos de la raza Peruano de Paso. Arequipa 2024**

Tesis presentada por el Bachiller:

Pacheco Sanchez, Victor Simon

ORCID: 0000-0003-2790-0124

para optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:

Mgter. Delgado Fernández, Ronnie Christian

ORCID: 0000-0003-2422-4837

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 21 de Agosto del 2025

Dictamen: 011851-C-EPMVZ-2025

Visto el borrador del expediente 011851, presentado por:

2015130211 - PACHECO SANCHEZ VICTOR SIMON

Titulado:

COMPARACIÓN DE AGENTES CRIOPROTECTORES DIMETILFORMAMIDA Y GLICEROL PARA MEJORAR LA FUNCIONABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE CABALLOS DE LA RAZA PERUANO DE PASO. AREQUIPA 2024

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

**16423061 - FERNANDEZ FERNANDEZ FERNANDO ALBERTO
DICTAMINADOR**



**29614489 - SANZ LUDEÑA CARLO EDISON
DICTAMINADOR**



**72547272 - CORNEJO ROQUE ROMELY FERNANDA
DICTAMINADOR**



COMPARACIÓN DE AGENTES CRIOPROTECTORES DIMETILFORMAMIDA Y GLICEROL PARA MEJORAR LA FUNCIONABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CRIOPRESERVADO DE CABALLOS DE LA RAZA PERUANO DE PASO. AREQUIPA 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	7%
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
3	repositorioinstitucional.uabc.mx Fuente de Internet	1%
4	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	studylib.es Fuente de Internet	1%
6	repositorio.uaaan.mx Fuente de Internet	1%
7	revistamvz.unicordoba.edu.co Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

A Dios, quien como guía esta siempre presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome entendimiento, conocimiento, sabiduría y las fuerzas necesarias para proseguir con mis sueños trazados en mi vida personal y profesional.

A la memoria de mi Sr. Padre Dr. Víctor Jorge Pacheco Carrasco, ejemplo constante y perdurable de lucha y superación (“nunca te deje pisar el poncho”) por siempre haber inculcado el ser mejor cada día.

A mi Sra. Madre doña Betty Elisa Sanchez Barriga, mi “Betty” con cariño para que una vez se sienta más y más orgullosa de lo que formo.

A mis queridos hermanos Elsa, a quien llevo en mi mente y corazón por siempre y para siempre; a Juan y Wendy por su cariño siempre presente.

A mis amigos, de verdad.

A todos ellos por los que luche, por los que me supere y que con su recuerdo me estimularon a hacer hasta el último esfuerzo por ayudarlos a sanar, a mis amiguitos esos perritos y gatitos:..... Carlota, Picho, Leonardo, King, Misha, Dulce, Chocolate, Tamalito, Valiente, Colitas, Traposin, Jorguito, y a los que me olvido pero que viven en mi mente,

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Mg. MVZ. Carlos Sanz Ludeña, por su ayuda y apoyo constante.

Al Mg. MVZ. Ronnie Christian Delgado Fernandez, por la amabilidad de aceptar la asesoría de este trabajo de investigación.

A mis amigos y colegas Dr. MV. Fernando Fernández, siempre por su ayuda constate, al Mg. MVZ. Gary Rolando Gandarillas por siempre estar apoyando.

Al Mg. MVZ. Jorge Zegarra Paredes, por demostrar siempre ser amigo, y a todos aquellos que siempre me dieron una frase de ayuda.



RESUMEN

El semen equino es uno de los más difíciles de criopreservar de la industria de manera eficiente sin causar daños en la membrana. La presente investigación de nivel relacional, cuyo objetivo comprar el efecto de dos crioprotectores: dimetilformanida (DMF) versus glicerol (GLY) sobre la motilidad, morfología y viabilidad del semen del caballo peruano de paso. Se colecto de semen de 4 ejemplares, las evaluaciones se realizaron en Instalaciones del laboratorio Diagnovet SAC. Las muestras se recolectaron mediante vagina artificial cada 10 días, se obtuvo 4 eyaculados por ejemplar, obteniéndose alícuotas para con dilutor adicionado con 4 concentraciones (1, 2, 3 y 4%) de DMF y GLY. Se congelaron las pajillas y posterior a la congelación se analizó la motilidad, morfología y viabilidad espermática. Obtuvimos resultados para motilidad espermática de 44,56 % +/- 2.45%, para la concentración de DMF al 2% frente a 40.69 % +/- 2.30% para la concentración de GLY al 1% siendo altamente significativo. La morfología espermática normal fue de 72,50 % +/- 2.53%, para la concentración de DMF al 2% frente a 71,19 % +/- 2.17% para la concentración de GLY al 2% siendo altamente significativo. La viabilidad espermática fue de 44,25 % +/- 2.14%, para la concentración de DMF al 2% frente a 42.69 % +/- 2.02% para la concentración de GLY al 2% siendo altamente significativo. Se concluye que el efecto del crioprotector en la motilidad es altamente significativo al igual que la concentración, sin embargo al comparar las medias solo la concentración al 4% tanto| de DMF y GLY son significativamente diferentes ($p < 0,05$); para morfología normal, tanto el crioprotector como la concentración no son significativas, al comparar sus medias no son significativamente diferentes ($p > 0,05$); finalmente para la viabilidad espermática el efecto crioprotector y concentración son altamente significativos y al comprar sus medias solo la concentración al 4% tanto| de DMF y GLY son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Palabras clave: Crioprotector, glicerol, dimetilformamida.

ABSTRACT

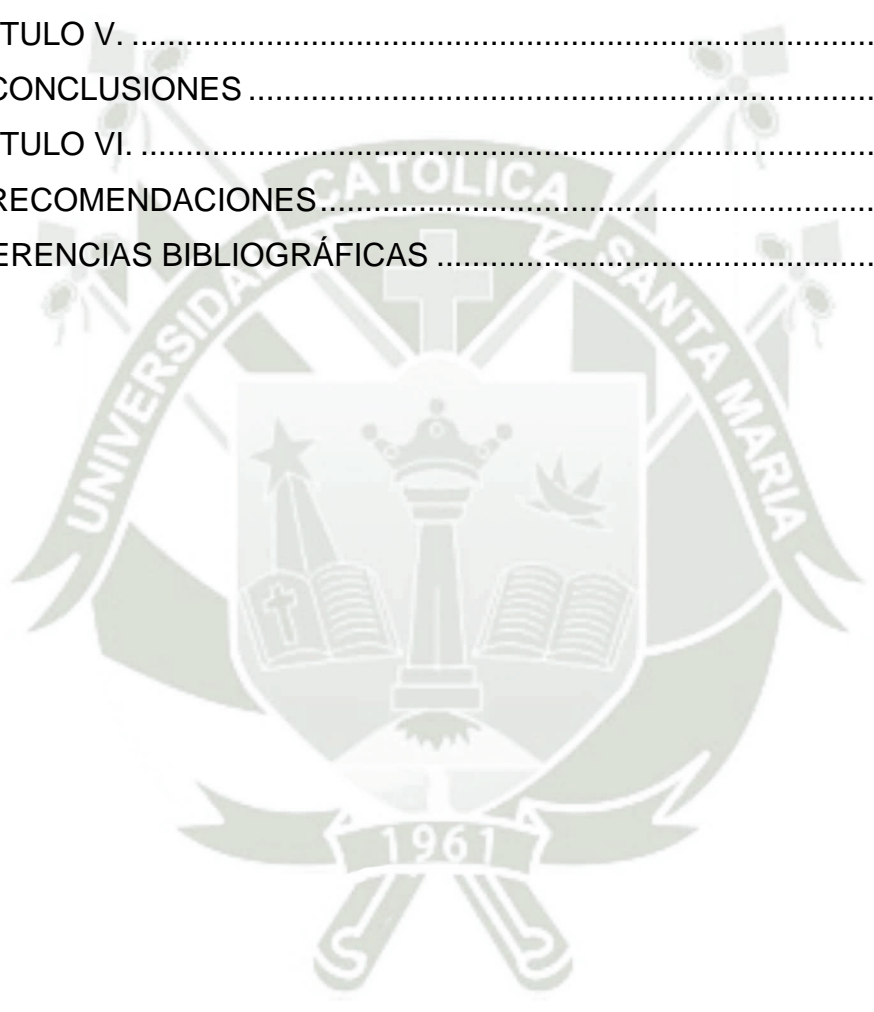
Equine semen is one of the most difficult in the industry to cryopreserve efficiently without causing membrane damage. This relational-level research aims to compare the effect of two cryoprotectants: dimethylformamide (DMF) versus glycerol (GLY) on the motility, morphology, and viability of Peruvian Paso horse semen. Semen was collected from 4 specimens; evaluations were performed at the Diagnovet SAC laboratory facilities. Samples were collected through an artificial vagina every 10 days, 4 ejaculates per specimen were obtained, and aliquots were obtained with a diluent added with 4 concentrations (1, 2, 3, and 4%) of DMF and GLY. The straws were frozen, and after freezing, sperm motility, morphology, and viability were analyzed. We obtained results for sperm motility of 44.56% +/- 2.45%, for the 2% DMF concentration versus 40.69% +/- 2.30% for the 1% GLY concentration being highly significant. Normal sperm morphology was 72.50% +/- 2.53%, for the 2% DMF concentration versus 71.19% +/- 2.17% for the 2% GLY concentration being highly significant. Sperm viability was 44.25% +/- 2.14%, for the 2% DMF concentration versus 42.69% +/- 2.02% for the 2% GLY concentration being highly significant. It is concluded that the effect of the cryoprotectant on motility is highly significant as is the concentration, however when comparing the means only the 4% concentration is both | DMF and GLY are significantly different ($p < 0.05$); for normal morphology, both the cryoprotectant and the concentration are not significant, and when comparing their means, they are not significantly different ($p > 0.05$); finally, for sperm viability, the cryoprotective effect and concentration are highly significant, and when comparing their means, only the 4% concentration of DMF and GLY are significantly different ($p < 0.05$).

Keywords: Cryoprotectant, glycerol, dimethylformamide.

INDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	2
1.1 Enunciado del problema.....	2
1.2 Descripción del problema.....	2
1.3 Efecto en el desarrollo local o regional.....	2
1.4 Justificación.....	3
1.4.1 Aspecto General.....	3
1.4.2 Aspecto Tecnológico.....	3
1.4.3 Aspecto Social.....	5
1.4.4 Aspecto Económico.....	6
1.5 Objetivos.....	7
1.5.1 Objetivo general.....	7
1.5.2 Objetivos específicos.....	7
1.6 Hipótesis.....	7
CAPÍTULO II.....	8
2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL.....	8
2.1 Análisis bibliográfico.....	8
2.1.1. Estado actual de la industria de la inseminación equina.....	8
2.1.2 Glicerol (GLY).....	13
2.1.3 Dimetilformamida (DMF).....	14
2.1.4 Viabilidad Espermática.....	15
2.2 Antecedentes de la investigación.....	17
CAPÍTULO III.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Materiales.....	25
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Muestreo.....	27

3.2.2	Formación de unidades de estudio	28
3.2.3	Métodos de evaluación	28
3.2.4	Variable de respuesta	31
3.2.5	Evaluación estadística	32
3.2.6	Diseño experimental	33
CAPÍTULO IV		34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO V		74
5.	CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO VI		75
6.	RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		76



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Motilidad de espermios del eyaculado.....	35
Tabla 2.	Test de Bondad de Ajuste de Shapiro Wilks para la movilidad de espermios de eyaculado de CPP.....	36
Tabla 3.	Medidas de resumen para la movilidad de espermios del eyaculado de CPP	37
Tabla 4.	Distribución de frecuencias para la movilidad de espermios del eyaculado de CPP	40
Tabla 5.	Morfología normal de espermios del eyaculado de CPP.....	44
Tabla 6.	Test de Bondad de Ajuste para la movilidad espermática del eyaculado fresco de CPP	45
Tabla 7.	Medidas de resumen para la morfología de espermios del eyaculado de CPP	46
Tabla 8.	Distribución de frecuencias para la morfología de espermios del eyaculado de CPP	48
Tabla 9.	Viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	49
Tabla 10.	Test de Bondad de Ajuste para viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	50
Tabla 11.	Medidas de resumen para la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	50
Tabla 12.	Distribución de frecuencias para la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	52
Tabla 13.	Concentración de espermios del eyaculado (millones/ml)de CPP.....	53
Tabla 14.	Test de Bondad de Ajuste para la concentración de espermios del eyaculado de CPP	54
Tabla 15.	Medidas de resumen para la concentración de espermios del eyaculado de CPP.....	55
Tabla 16.	Distribución de frecuencias para la concentración de espermios del eyaculado de CPP	56
Tabla 17.	Motilidad de los espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF	57
Tabla 18.	Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la movilidad de espermios poscongelamiento.	58

Tabla 19. Morfología normal de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF.....	59
Tabla 20. Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la morfología de espermios poscongelamiento.....	60
Tabla 21. Viabilidad de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF	61
Tabla 22. Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la viabilidad de espermios poscongelamiento.....	61
Tabla 23. Movilidad de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY.....	62
Tabla 24. Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la movilidad de espermios poscongelamiento.	63
Tabla 25. Morfología normal de las muestras de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY	64
Tabla 26. Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la morfología normal de espermios poscongelamiento.....	64
Tabla 27. Viabilidad espermática de las muestras de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY	65
Tabla 28. Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la viabilidad de espermios poscongelamiento.....	66
Tabla 29. Medidas de resumen de los 2 crioprotectores (DMF y GLY) a las 4 concentraciones para Movilidad, morfología y viabilidad en espermios	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	QQ-Plot de la normalidad grafica de la movilidad de espermios del eyaculado de CPP	35
Figura 2.	Blox-Plot de las medidas de resumen de la movilidad de espermios del eyaculado CPP	38
Figura 3.	Histograma de la movilidad espermática de espermios de CPP	40
Figura 4.	QQ-Plot de la normalidad grafica de la morfología normal de espermios del eyaculado de CPP	45
Figura 5.	Blox-Plot de las medidas de resumen de la morfología de espermios del eyaculado de caballo PPP	47
Figura 6.	Histograma de la morfología de espermios del semen fresco de caballo Peruano deo	48
Figura 7.	QQ-Plot de la normalidad grafica de la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	49
Figura 8.	Blox-Plot de las medidas de resumen de la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	51
Figura 9.	Histograma de la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP	52
Figura 10.	QQ-Plot de la concentración de espermios del eyaculado de (millones/ml) de CPP	54
Figura 11.	Box-Plot comparando las medidas de resumen de la concentración espermios del eyaculado de CPP	55
Figura 12.	Histograma de la concentración de espermios del eyaculado de CPP	56
Figura 13.	Blox plot de las medidas de resumen de los valores de movilidad de espermios post descongelamiento	58
Figura 14.	Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología de espermios post descongelamiento	60
Figura 15.	Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología de espermios post descongelamiento	62
Figura 16.	Blox plot de las medidas de resumen de los valores de movilidad de espermios post descongelamiento	63
Figura 17.	Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología normal de espermios post descongelamiento	65

Figura 18. Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología normal de espermios post descongelamiento 66

Figura 19. Viabilidad espermática de espermios del eyaculado de CPP 99

Figura 20. Histogramas, con ajuste de la curva normal de la movilidad, morfología normal y viabilidad de del eyaculado de CPP 101

Figura 21. Box-Plot comparando las medidas de resumen de la movilidad, morfología normal y viabilidad de espermios del eyaculado de CPP.
..... 102



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos y gráficos estadísticos del análisis de datos	99
Anexo 2. Comparación de las medidas de resumen de los dilutores con DMF y GLY.....	103
Anexo 3. Análisis de la varianza de los dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática.....	105
Anexo 4. Test de Tukey de los dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática.....	109
Anexo 5. Comparación de semen fresco versus semen posdescongelamiento dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática	110
Anexo 6. Plantilla de datos obtenidos para la motilidad, morfología y viabilidad espermática	111
Anexo 7. Análisis de varianza de los dilutores GLY y DMF para la movilidad, morfología y viabilidad espermática.....	116
Anexo 8. Comparación de medias y DE de los dilutores DMF y GLY a las 4 concentraciones.....	120
Anexo 9. Comparación de medias y DE de los dilutores DMF y GLY a las 4 concentraciones para movilidad, morfología y viabilidad.....	121

INTRODUCCIÓN

La industria equina, engloba una serie de actividades económicas, que van desde los bins y servicios relacionados con los equinos como son desde la reproducción, la salud, hasta los diversos deportes, pasando por la recreación y otras actividades anexas. Es así como su impacto implica unos 300 mil millones de dólares y da lugar a 1,6 millones de empleos a tiempo completo. Nuestro país no es exento a esto y aun más que poseemos la raza peruana de paso considerada “Producto Bandera” es necesario tener a la vanguardia los conocimientos de biotecnologías reproductivas que permitan explotar al máximo el potencial reproductivo de los ejemplares considerados superiores. Sin embargo, al evaluar el origen de nuestra raza de caballos vemos que tienen en sus ancestros razas que se consideran como problemáticas para la reproducción animal cuando se somete sus células espermáticas a los diferentes procesos de refrigeración y congelación. Por ello es necesario el estudio e investigación continuo y fundamentado de los nuevos Agentes Crioprotectores (ACP), que permitan mejorar la funcionabilidad espermática, permitiendo el almacenamiento de material genético, para diferentes usos. Es así que muchos años atrás se empleaba el glicerol (GLY) como crioprotector, sin embargo numerosos estudios señalan no buenos resultados en la especie equina, por ello pretendemos emplear otras sustancias con la finalidad de mejorar las respuestas a la congelación como es el caso de la dimetilformamida (DMF), amida con respuestas prometedoras en cuanto a motilidad, morfología y viabilidad espermática en los equinos, la cual se evalúa en diferentes concentraciones para ver cuál de ellas presenta mejor respuesta desde el punto de vista de la clínica reproductiva equina y significancia estadística.

CAPÍTULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1 Enunciado del problema

Comparación de agentes crioprotectores dimetilformamida y Glicerol, para mejorar la funcionabilidad espermática en semen criopreservado de caballos de la raza Peruano de Paso. Arequipa. 2024

1.2 Descripción del problema

El semen equino es uno de los más difíciles de criopreservar de la industria de manera eficiente sin causar daños en la membrana o apoptosis.

La inseminación artificial en equinos mediante el empleo de semen criopreservado, requiere que este sea de calidad, que permita asegurar la fertilidad de este, sin embargo, existe entre los padrillos una gran variabilidad individual, que también ha sido estudiada entre las diversas razas. El proceso de criopreservación (CP) implica una serie de técnicas y pasos que directa o indirecta influyen sobre la calidad espermática. Es por esto que los agentes crioprotectores empleados, se deben estudiar más específicamente y probar algunos de ellos para mejorar el proceso de CP espermática. Algunos de los más comúnmente usados como el glicerol (GLY) han sido reportados como tóxicos, lo que ha llevado a la investigación y prueba de otros Agentes Crioprotectores (CPA), dejando la puerta abierta a otros como las dimetilformamidas (DMF), aminos, las cuales parecen ser muy prometedoras y dar mejores características de crioprotección, evitando el criodaño de los espermatozoides en la especie equina en particular de nuestra raza Peruano de Paso.

1.3 Efecto en el desarrollo local o regional

Una de las biotecnologías más desarrolladas a nivel mundial y por ende a nivel de nuestro país, es la inseminación artificial (IA) , la aplicación en la especie equina y la raza Peruano de Paso, se están desarrollando cada vez en gran parte de nuestro país, esto crea la necesidad de enviar semen a diferentes

lugares, muchas veces se requiere dosis de semen criopreservadas pero muchas veces nos damos con la sorpresa que algunos padrillos no tienen buen semen para congelar, entonces debemos poner en práctica otras técnicas y evaluar nuevos crioprotectores como las DMF, los cuales al actuar como CPA, muchas veces podrían mejorar la calidad seminal posdescongelamiento aumentando los índices de fertilidad.

1.4 Justificación

1.4.1 Aspecto General

Actualmente, los progresos e investigaciones realizadas para dilucidar lo qué acontece durante el proceso de CP seminal en el equino, aunado a la gran variabilidad de los individuos que existe con respecto a la congelabilidad, crea problemas que retrasan la homogenización de los protocolos, y por lo que reduce limitadamente el empleo de esta metodología en la industria equina (83).

Uno de las causas más implicadas en frenar el desarrollo a gran nivel de la técnica de la IA en equinos con semen crioprocesado para explotar al máximo esta tecnología es que se pueda estandarizar, sin embargo la variación de cada individuo presente entre las diferentes razas y sementales no lo permite (83; 12; 11, 14; 84).

Se ha podido determinar la existencia de variaciones en lo referido a la calidad del semen entre diferentes razas (60). Tal es así que el caballo de Pura Raza Española (PRE) se considera que presenta mala calidad seminal (18), hay que recordar, que es de la cual genealógicamente desciende la raza Peruano de Paso.

Durante los últimos años, se informó una mejora en la capacidad de las células espermáticas de caballos al proceso de CP, lo sucedió con el cambio del glicerol por otros ACP.

1.4.2 Aspecto Tecnológico

Demick y col. en 1976 (85), en sus investigaciones pudieron ver una disminución marcada de la fertilidad del semen de caballos refrigerado en dilutores que contenían como agente crioprotector al glicerol.

Tselutin y col., en 1999 (49) determinaron que para diferentes tipos de semen de aves el glicerol se consideraba altamente tóxico.

El uso de ACP alternativos se ha propuesto como una alternativa para reducir el estrés osmótico durante el proceso de criopreervación de una muestra seminal de equino, ya que se informa que el glicerol pudiera poseer efectos tóxicos en las células espermáticas de esta especie (53, 49). Los cuales se pueden reducir con el empleo de otras sustancias con menor peso molecular como es el caso de las amidas (53).

Sin embargo, pueden producirse cambios en los fosfolípidos de membrana espermática alterando su estabilidad y permeabilidad, lo que conduce a una reducción de la longevidad, capacitación rápida y en consecuencia reducción la capacidad fertilizante de las células espermáticas (86).

Entre los efectos de la toxicidad asociados al GLY podemos mencionar:

- 1) alteración directa de la bicapa lipídica;
- 2) interacción con las proteínas integrales de membrana y glicoproteínas,
- 3) inducen del aumento de la demanda bioenergética (87, 88, 89, 90, 91, 92)

Recientes estudios, concluyeron que algunas amidas posibilitan una mejor resistencia de los espermatozoides a la CP del eyaculado de la mayoría de los caballos, especialmente los catalogados como malos congelantes (54).

Estos efectos se encuentran relacionados al incremento de la viscosidad ocasionados por GLY a nivel intracelular, puede verse al Microscopio Electrónico (ME) cambios de los microtúbulos y glicocalyx de la membrana, desnaturalización de proteínas e inducción de zonas de membrana libres de proteínas (91).

La respuesta de la membrana plasmática a cada tipo de crioprotector puede determinar el grado de movimiento de agua y de iones a través de ella (93).

Se cambian las tasas de permeabilidad al agua, afectando así la supervivencia de la célula espermática a los procesos que se realizan durante la CP (94). También se produce aumento de la osmolalidad en el medio extracelular con el consecuente estrés osmótico sobre el espermatozoide y ocurrencia de reacción acrosómica (95).

Los equinos, muestran una mayor sensibilidad a la toxicidad del GLY, lo que ha promovido la búsqueda de nuevos crioprotectores. En la literatura existe escasa información relacionada a la temática del empleo de amidas como ACP para espermatozoides en la especie equina, sin embargo, existe una gran cantidad de datos relacionados con el uso de este compuesto en la CP de semen de otras especies.

1.4.3 Aspecto Social

Últimamente el interés por el empleo de semen refrigerado y congelado en la industria equina ha crecido la prevalencia de este fenómeno está aumentando, con razas significativas como la peruana de Paso entre las permitidas para utilizar este procedimiento. Actualmente, el 80% de las asociaciones de cría de caballos en los Estados Unidos y muchos otros países permiten la compra y venta, así como la utilización de semen criopreservado, lo que impulsa la investigación para mejorar los procesos de refrigeración y congelación y mejorar las tasas de supervivencia después de la descongelación. La investigación sobre métodos óptimos para la conservación y almacenamiento del semen es crucial en la reproducción animal, ya que permite maximizar los animales con un potencial genético superior y facilita la preservación indefinida de linajes genéticos de animales en riesgo de extinción (96).

1.4.4 Aspecto Económico

Actualmente, existen nuevas propuestas con respecto a la CPde semen que implican variar la duración de la congelación, los diluyentes y los crioprotectores. Muchas de estas metodologías son tan intrincadas que las entidades comerciales, en particular las corporaciones multinacionales que distribuyen semen, las consideran secretos industriales genuinos. Los gastos asociados con ciertos diluyentes son considerablemente elevados. Es así que, si la DMF disminuye el criodaño y mejora la fertilidad de los espermatozoides, puede representar un ahorro en el costo de los diluyentes de congelación y una mejor fertilidad.

Las técnicas para congelar semen equino no han variado en los últimos 10 a 15 años y no son aplicables a todas las razas y tienen una variedad individual de los padrillos.

El empleo de ACP alternativos se han propuesto como una medida para reducir el estrés osmótico durante el proceso de congelación del eyaculado equino, ya que se ha reportado que el GLY parece tener efectos tóxicos en espermatozoides de esta especie (53, 85).

La toxicidad puede reducirse con el empleo de compuestos con un peso molecular menor como algunas amidas (53).

Un nuevo dilutor para congelación que contenga como agente crioprotector a la DMF abre las posibilidades de transporte y almacenaje de semen criopreservado en diferentes lugares de nuestro país y en especial en los padrillos conocidos como malos congeladores.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la DMF frente al del GLY como criopreservante para mejorar el proceso de criopreservación espermática y asegurar la viabilidad espermática en equinos de la raza Peruano de Paso. Arequipa.

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar la motilidad espermática post descongelación en semen criopreservado mediante DMF versus Glicerol
- Evaluar la morfología espermática post descongelación en semen criopreservado mediante DMF versus Glicerol
- Evaluar la funcionabilidad espermática post descongelación, en semen criopreservado mediante DMF versus Glicerol mediante la prueba de endosmosis.

1.6 Hipótesis

Dado que la Dimetilformamida (DMF) es un agente crioprotector de tipo penetrante al igual que el glicerol (GLY) es probable que, al compararlos, podamos determinar cuál de los dos ofrece mayores ventajas sobre la funcionabilidad de las células espermáticas durante el proceso de criopreservación espermática en equinos de la raza Peruano de Paso.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

2.1 Análisis bibliográfico

2.1.1. Estado actual de la industria de la inseminación equina

En el sector reproductivo equino, los métodos de inseminación artificial han avanzado ampliamente; sin embargo, la utilización de dosis seminales criopreservadas es menos frecuente que en otros animales a causa de los inconvenientes relacionados con la viabilidad del espermatozoides y la variabilidad individual. Las restricciones indican que la IA con semen criopreservado en equinos es menor que en otras especies, y un objetivo primordial es identificar tecnologías y procesos para mejorar el número de machos reproductores y muestras seminales adecuadas para enfriar y/o congelar.

2.1.1.1 Técnicas fundamentales de criopreservación seminal equina

El proceso de CP, es una actividad que se emplea en las biotecnologías reproductivas de equinos y otras especies, para el mantenimiento durante largo tiempo de gametos y en especial de células espermáticas. Al contrario de los protocolos empleados en ovocitos o embriones, en las células espermáticas se usan procedimientos los cuales se fundamentan en la reducción de temperatura de una forma lenta y gradual, dado su conformación aplanada.

El avance significativo de la IA ha aumentado la atención de académicos y médicos veterinarios en los procedimientos de manejo y congelación espermática, lo que subraya la necesidad de estudiar y ensayar métodos que reduzcan el criodañado de los espermatozoides y al mismo tiempo mejoren su viabilidad, longevidad y fertilidad (1).

El procedimiento consiste, inicialmente en el retiro del plasma seminal por medio del proceso de centrifugación en una centrifuga de brazos oscilantes y con tubos para crioviales de 50 cc de capacidad.

Después de la centrifugación, el sedimento debe resuspenderse en un medio o extender de crioconservación al volumen y concentración especificados según el protocolo (2, 3). Déjelos descansar por un período para lograr el equilibrio. Gran número de los dilutores que contienen ACP poseen una osmolaridad significativamente más alta que las soluciones fisiológicas, dando como resultado la deshidratación del espermatozoide. Por lo tanto, es esencial proporcionar un período de equilibrio con el crioprotector para reducir el daño relacionado con la deshidratación. La temperatura disminuye a un ritmo dictado por las dimensiones y permeabilidad de la celda, sumergiéndose al final en nitrógeno líquido (N₂) a -196 °C. Los diluyentes para congelar semen consisten en varios componentes, incluidos ACP, azúcares, soluciones buffer, antimicrobianos y electrolitos (3).

Las células espermáticas sufren diferentes tipos de daños, tanto letales y subletales (4), los cuales explican la reducción de la fertilidad lograda por el semen descongelado de los sementales. Estos criodaños pueden deberse a variaciones fuertes de temperatura y osmolaridad del medio, así como al estrés oxidativo, asociándose este daño a la formación de cristales de hielo a nivel intracelular, que producen una pérdida de continuidad de la membrana plasmática. En estos momentos conocemos que la bajada de temperaturas a las que se someten las células espermáticas durante la criopreservación, impiden la formación de cristales de hielo, y en consecuencia el daño que sufren se produce principalmente debido al estrés osmótico y oxidativo (5, 6).

Es así, que la calidad espermática posterior al descongelamiento deriva de que estos gametos superen el procedimiento, sin perder sus funciones primordiales (viabilidad, motilidad, morfología y otros). Aunque la célula espermática está sometida a diversos tipos de estrés cabe resaltar que existe una interconexión entre ellos. Todos estos cambios conducen a la muerte de los espermatozoides y a la presentación de daños subletales similares a la apoptosis que disminuyen la vida media y la capacidad fecundante de las células (7).

2.1.1.2 Variabilidad individual en la criopreservación de semen equino

Smith y Polge escribieron el estudio inaugural sobre la criopreservación espermática en equinos en 1950, mediante el cual lograron 25% de espermatozoides vivos después de congelarlos a -79°C en una dilución de GLU y GLY. Posteriormente, se documentó el nacimiento de la primera cría equina concebida a partir de semen congelado (8).

Desde entonces, se han realizado extensas investigaciones sobre esta tecnología y, en el presente, la utilización de semen equino criopreservado es cada vez más mayor debido a sus ventajas inherentes. Sin embargo, está presente una variabilidad significativa en su calidad, atribuible a una ausencia total de estandarización tanto en la metodología de la IA como en las metodologías para evaluar la calidad seminal antes y después de la descongelación (9, 10, 11).

Entre las causas de la falta de estandarización en el proceso de CP seminal, encontramos la variabilidad individual entre los sementales (9, 12, 13, 14), que se deriva en gran medida de los métodos de selección empleados, basados primordialmente en la genealogía, rendimiento deportivo o la morfología, en lugar de la eficiencia reproductiva (15). En consecuencia, los aspectos reproductivos equinos son| más semejantes a la clínica reproductiva humana que a las de otras especies animales.

Amann y Pickett (16) sostuvieron que no es práctico suponer que todos los eyaculados de sementales se puedan congelar utilizando una metodología uniforme; más bien, es más efectivo adaptar los dilutores y las curvas de congelación y descongelación para cada espécimen individual.

Se han identificado variaciones en la calidad seminal entre razas (17), siendo la Pura Raza Española (PRE) un ejemplo de calidad espermática subóptima (18). La investigación sobre varias razas, indica que solo el 20-30% de los reproductores producen semen con una excelente capacidad de criopreservación, lo que se denomina "buenos congeladores". Aproximadamente el 40-60% exhibe una capacidad de congelación aceptable, aunque se ve afectada negativamente por la crioconservación, mientras que otro 20-30% produce semen que es completamente inadecuado para congelar,

lo que se conoce como "malos congeladores", a pesar de poseer tasas de fertilidad encomiables durante el apareamiento natural (14, 19, 20).

2.1.1.3 Criodaño en el espermatozoide equino

La calidad espermática luego del proceso de CP va a depender de la capacidad del esperma para resistir estos procesos al tiempo que conserva sus funciones primarias (13). El deterioro de cualquier función individual puede disminuir o incluso eliminar la fertilidad espermática (16). Durante la CP, los espermatozoides experimentan daños letales y subletales muy parecidos a la muerte celular programada (21, 22, 13). Factores que influyen en la viabilidad e integridad de las células espermáticas, afectando así su vida media y potencial de fertilización (23, 24, 22).

Los daños que se dan durante la CP seminal han sido categorizados por diferentes investigadores en función de su origen: estrés térmico por fluctuaciones de temperatura, estrés osmótico por osmolalidad y estrés oxidativo por la influencia de agentes oxidantes, todos los cuales están interrelacionados.

2.1.1.4 Proceso de criopreservación del eyaculado de caballos

Los procedimientos de criopreservación de material seminal equino pasan por una metodología que se basa en (25, 26, 27):

- Dilución con el extender o dilutor.
- Procedimos a centrifugar para lograr la separación del paquete seminal del plasma.
- Incorporación del diluyente de congelación
- Refrigeración para lograr el equilibrio térmico.
- Empajillado en los Straw de 0.5 cc.
- Húmedo en nitrógeno líquido,
- Congelación
- Almacenamiento en termo
- Descongelación de las pajillas.
- Evaluación posterior al descongelamiento.

2.1.1.5 Agentes Crioprotectores (CPA)

El semen de equinos en especial es muy individualista, ya que no hay dos sementales que tengan la misma composición química y, por lo tanto, cada uno se congelará de manera diferente. Se sabe que algunas personas son hipersensibles al GLY, mientras que otras pueden tolerarlo bien. Siguiendo las demandas de la industria, se ha desarrollado una amplia variedad de ACP, así como diferentes disponibles comercialmente. El consenso actual es que los ACP funcionan minimizando la exposición al estrés osmótico, estabilizando la biomolécula y la estructura, y limitando los efectos de las especies oxidativas reactivas (ROS) (28, 29).

El CPA ideal no deshidrataría osmóticamente la célula ni induciría criolesiones y no sería tóxico (30).

El objetivo de una CPO debe ser minimizar la congelación intracelular, minimizar el daño celular debido al ambiente de congelación y promover la supervivencia celular tras la descongelación (31).

Se ha demostrado que mayores cantidades de concentraciones de CPA conducen a un mayor daño celular; ya que las células expuestas a esos solutos penetrantes experimentan una intensa deshidratación inicial, luego una rehidratación, lo que resulta en la posibilidad de que ocurra una hinchazón celular macroscópica cuando se elimina el CPO. En última instancia, estos cambios radicales en el volumen y el tamaño pueden provocar daños y la muerte de los espermatozoides (32).

Son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la temperatura más baja a la cual se puede fundir una mezcla de solutos con una composición fija.

La disminución de este permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometido, es decir, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula queda más protegida (33).

Keith (1998) (34), clasificó los crioprotectores en dos categorías:

- No permeables, como los lipídicos, las lipoproteínas y macromoléculas de yema de huevo, la leche y derivados, carbohidratos como la GLU
- Permeables, como GLY, etilenglicol, las amidas, Dimetilsulfoóxido (DMSO...)

2.1.2 Glicerol (GLY)

Trabajado inicialmente por Polge y col., en 1949, desde ese momento se desempeña como el ACP más empleado en la CP espermática en diferentes especies, una de ellas los équinos (35, 36). Esta formulación, que permanece casi sin cambios, ha sido el pilar de la industria de la congelación desde entonces.

En la actualidad es el ACP más empleado, no existiendo hasta la actualidad uniformidad con relación a la concentración adecuada en los dilutores comerciales para équinos, la cual está en un amplio rango del 2,5 al 7% (37, 38, 39, 25, 40, 14). Sus diferentes efectos dependen la composición del dilutor y de la concentración y del porcentaje de yema de huevo que esté presente (41).

Se ha observado que es el ACP más eficaz para reducir la congelación intracelular del agua (42) a la vez que proporciona ajustes de osmolalidad a través de una protección térmica invasiva (43).

La investigación para comprender los mecanismos de los ACP condujo al descubrimiento de la eficacia del glicerol en su capacidad para prevenir varias transiciones de fase durante la congelación a través del aumento de la permeabilidad al agua y la fluidez de las membranas de los espermatozoides (44).

Sin embargo, aunque el glicerol ha permitido la Criopreservación (CP) de numerosas especies, puede que no sea el CPA ideal.

Además, mientras que el GLY sirve como el principal ACP para muchas especies, ese no fue el caso de la especie equina. Proporciona una protección satisfactoria para aproximadamente el 20% de los animales clasificados como

"buenos congeladores", habiéndose demostrado ser insatisfactorio para el 80% restante debido a su gran viscosidad y peso molecular. Además, se ha demostrado que el glicerol es tóxico para los espermatozoides no congelados y tiene efectos anticonceptivos en las yeguas (45).

Los problemas reportados debidos al efecto toxico del GLY han llevado a la investigación y prueba de innumerables otros ACP de tipo penetrantes, con la idea de encontrar uno que sea menos tóxico, al tiempo que produce respuestas comparables o de mejor calidad (46).

2.1.3 Dimetilformamida (DMF)

Entre los diferentes ACP que se emplean como alternativos destacan los pertenecientes a los compuestos conocidos como las amidas que han sido usadas en formulaciones únicas o en diferentes combinaciones con GLY en caninos (47), porcinos (48), aves (49), peces (50) y équinos (51; 52; 53), con la finalidad de reducir la toxicidad que tiene el GLY y mejorar la movilidad, viabilidad y fertilidad de las células espermáticas

Entre las amidas que han dado respuestas optimas y que se comportan como ACP en el eyaculado equino, tenemos a la DMF Y MF con un peso molecular de 73,09 g/mol y 50,07 g/mol respectivamente (54)

Las investigaciones iniciales que emplearon amidas como ACP en reemplazo al GLY en la crioconservación del eyaculado equino mostraron una mejor respuesta o equivalencia al GLY, particularmente la DMF y MF (54, 56, 57,58, 59).

Se descubrió que la acetamida era peligrosa. Investigaciones posteriores realizadas por investigadores brasileños han demostrado las ventajas de utilizar amidas, ya sea individualmente o en mezclas con GLY, como ACP para el eyaculado equino en comparación con el uso exclusivo de glicerol (56, 57, 58, 54, 59).

Además, la aplicación de amidas como ACP, mejora la viabilidad de las células espermáticas del equino dentro del tracto reproductor femenino y aumenta la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el GLY, incluso en équidos que exhiben una fuerte tolerancia (60).

Su uso reduce la variabilidad individual y racial en la movilidad e integridad de la membrana plasmática en la evaluación post descongelación, mejorándose estas características principalmente en caballos clasificados como “malos congeladores” (54, 60).

Se ha demostrado que el DMF mejora la motilidad posterior a la descongelación, preservando las membranas celulares, lo que puede mejorar eficazmente el potencial de congelación del semen (61).

Con pesos moleculares más bajos, tanto el DMF como el MF son capaces de penetrar en los espermatozoides de los sementales, de manera más eficiente que el glicerol, lo que ha resultado en una reducción de la hinchazón durante el equilibrio en diluyentes que contienen amida y no es tan tóxico como el glicerol (62).

Sin embargo, DMF y MF parecen ser las únicas amidas con posibles efectos criogénicos. Los estudios han demostrado que otras amidas tienen efectos perjudiciales sobre el semen que no son crioprotectoras.

2.1.4 Viabilidad Espermática.

La viabilidad espermática indica la integridad de las membranas plasmáticas (MP) y acrosómica (MA) de los espermatozoides, una métrica previamente vinculada a la fertilidad probable de una muestra seminal (63).

Esta evaluación es un componente crucial del espermiograma, dada la importancia de esta estructura para mantener la viabilidad del esperma (64).

La determinación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática es crucial para evaluar la fertilidad del macho, ya que la preservación del

material genético depende esencialmente del estado óptimo de esta estructura (65, 66).

Además, es crucial no solo para el metabolismo espermático sino también para otros procesos de fertilización, incluida la capacitación, la respuesta del acrosoma y la fusión con el óvulo (67).

Entre las pruebas funcionales tenemos la prueba de endosmosis (HOST-test) la cual nos permite verificar la funcionabilidad total de la membrana plasmática espermática, evaluando su funcionalidad al comprobar la resistencia osmótica de ella en medios hipoosmóticos (68).

El espermatozoide puede absorber o expulsar agua en función de la osmolaridad del entorno extracelular (69, 70), lo cual es crucial para el correcto funcionamiento de su membrana plasmática y la regulación de la distribución de fluidos dentro y fuera de la célula (71, 72, 73). Este parámetro también se ha asociado con la fertilidad masculina (68).

Es así que el uso de semen criopreservado en las modalidades de semen refrigerado y congelado en la especie equina ha logrado gran relevancia en los últimos años, no solo a nivel mundial, si no que ha tenido un aumento en cuanto a su empleo en América Latina y nuestro país no se ha quedado relegado en esto, muy en especial al contar la raza Caballo Peruano de Paso, declarada “producto bandera” del Perú.

2.2 Antecedentes de la investigación.

- **El diluyente que contiene dimetilformamida añadido con sacarosa mejora la calidad in vitro después de congelar/descongelar el espermatozoide de semental (74).**

El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la sacarosa en la calidad del semen equino post-descongelado. Se recolectaron muestras de semen ($n = 24$) de seis sementales. Se diluyeron (200×10^6 espermatozoides/ml) en un medio de congelación a base de leche desnatada, yema de huevo, dimetilformamida y suplementado con sacarosa a concentraciones de 0 (Control), 25, 50 y 100 mM y en un diluyente comercial (BotuCrio). Posteriormente, se llenaron en pajuelas (0,5 ml) y se sometieron a congelación y almacenamiento (-196°C). Inmediatamente después de la descongelación (37°C , 30 segundos), se evaluaron muestras de semen para determinar la cinética (CASA), la integridad del plasma y de la membrana acrosómica y el potencial de la membrana mitocondrial (citometría de flujo). La adición de sacarosa de 50 y 100 mM al diluyente de congelación incrementó ($P < 0,05$) la TM, PM, VCL, VSL y VAP, en comparación con el grupo control. El parámetro WOB del grupo suplementado con 100 mM de sacarosa fue ($P < .05$) que el grupo control. Se observaron valores más altos ($P < .05$) de ALH y BCF en los grupos tratados con sacarosa (25, 50 y 100 mM), en comparación con BotuCrio. El semen congelado en presencia de 100 mM de sacarosa presentó mayores porcentajes ($P < .05$) de espermatozoides con plasma intacto y membranas acrosómicas, y alto potencial de membrana mitocondrial en relación con los otros grupos. Se concluyó que la adición de sacarosa al diluyente aumenta la motilidad (50 y 100 mM), la conservación de la membrana plasmática íntegra y de la membrana acrosómica y el alto potencial de membrana mitocondrial de las células espermáticas (100 mM) después de la descongelación.

- **Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos (75).**

La amalgamación de ACP penetrantes como GLY y DMF han mostrado resultados prometedores en la crio preservación del espermatozoides de caballo. Este estudio evaluó la eficacia crioprotectora de GLY, DMF y su combinación, DMF-GLY, en la criosupervivencia de células espermáticas de caballo. Con este fin, se obtuvieron 24 eyaculados de cuatro sementales árabes sanos y sexualmente maduros (6 eyaculados por semental). Cada eyaculado se diluyó primero con el diluyente especial Botusemen y posteriormente se congeló usando el diluyente Botusemen-Gold, que se aumentó con GLY (5%), DMF (5%) y una mezcla de GLY-DMF (3% -3%), empleando vapores de nitrógeno líquido estático (NL2). Las características cinemáticas y la integridad de la membrana espermática de muestras de eyaculado frescas y congeladas-descongeladas se evaluaron utilizando el sistema computarizado CASA (SCA-Evolution-2018 ILI) y la prueba de doble tinción fluorescente (PI / PNA-FITC), respectivamente. Los hallazgos indicaron que DMF, ya sea independientemente o en conjunto con GLY (DMF-GLY), fue superior en la protección de los espermatozoides equinos, produciendo valores significativamente elevados ($P < 0.05$) para la motilidad total (MT %), motilidad progresiva (MP %), velocidad curvilínea (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido del flagelo (BCF) en comparación con GLY. La combinación de DMF/GLY dio como resultado velocidades rectilíneas (VSL) y promedio (VAP) significativamente más altas ($P < 0,05$), integridad de la membrana plasmática (IMP %) e integridad acrosómica (IMA, %) en comparación con DMF o GLY solos. En conclusión, el DMF-GLY con el diluyente base no sintético Botusemen-Goldaii demostró ser más eficaz para la crioprotección de espermatozoides de caballo árabe, lo que se evidencia por una cinemática e integridad membranal mayor en comparación con el GLY.

- **Avances en la criopreservación de espermatozoides en animales de granja: Bovinos, equinos, porcinos y ovinos (76).**

El objetivo fue brindar una actualización sobre la criopreservación de espermatozoides en animales de granja. Se describen los principales efectos perjudiciales de este proceso, incluyendo la repercusión negativa en el rendimiento reproductivo. Además, se discute el uso potencial de biomarcadores moleculares para predecir la criotolerancia espermática, así como la adición de sustancias que pueden mitigar el impacto nocivo de la congelación y descongelación en las células espermáticas. La criopreservación de espermatozoides es uno de los procedimientos más importantes en el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida. En algunos animales de granja, el uso de espermatozoides criopreservados tiene tantos beneficios que su relevancia se ha hecho más evidente en las últimas décadas. Sin embargo, los valores de la calidad del espermatozoide después de la descongelación son variables entre especies y dentro de individuos de la misma especie. No existe una metodología estandarizada para cada una de las etapas del procedimiento de criopreservación (examen andrológico, recolección de semen, dilución, centrifugación, resuspensión del pellet con el medio de congelación, envasado, congelación y evaluación de espermatozoides post-descongelación), lo que también contribuye a las diferencias entre los estudios. Se han evaluado marcadores de criotolerancia de espermatozoides y plasma seminal (SP) para predecir la congelabilidad del eyaculado. Además, en investigaciones anteriores, se ha centrado en complementar los medios de criopreservación con diferentes sustancias, como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En la mayoría de los estudios, la inclusión de estas sustancias ha llevado a una mejora de la calidad del espermatozoide después de la descongelación y a la capacidad de fertilización como resultado de minimizar los efectos adversos sobre la estructura y función del espermatozoide. Otro enfoque es el uso de diferentes crioprotectores.

- **Efectos de diferentes concentraciones y combinaciones de crioprotectores sobre la calidad del espermatozoides y la integridad funcional en tres razas de caballos indios (77).**

Tradicionalmente, el GLY se utiliza como crioprotector principal y su toxicidad podría ser una razón para los diferentes resultados en la criopreservación y la fertilidad de las células espermáticas de los sementales. En un esfuerzo por minimizar la toxicidad de GLY, se han investigado agentes crioprotectores alternativos como la DMF. El efecto del crioprotector y la dosis del agente crioprotector varía de una raza a otra y también de un semental a otro dentro de la misma raza. Teniendo en cuenta estos factores, se diseñó un estudio para estudiar los efectos de GLY y DMF a diferentes concentraciones y combinaciones sobre la membrana plasmática, el acrosoma y la integridad del ADN, así como otras características seminales posteriores a la descongelación del semen de tres razas de sementales indígenas. En el estudio actual, se recolectó semen de sementales aparentemente sanos de 4 a 6 años, 3 de raza Marwari, 3 de Manipuri y 3 de raza Zanskari. Después de la recolección de semen y la evaluación del semen fresco, cada muestra de semen se amplió con un extensor de semen que contenía diferentes concentraciones y combinaciones de crioprotectores GLY y DMF (es decir, 5% GLY, 5% DMF, 2% GLY, 2% DMF, 2,5% GLY + 2,5% DMF y 1% GLY + 1% DMF) y se congeló. La evaluación del semen posterior a la descongelación se realizó sobre la base de la motilidad posterior a la descongelación, el recuento de espermatozoides vivos, la prueba de hinchazón hipoosmótica, la integridad acrosómica y la integridad del ADN. El semen crioprocesado mostró que los valores de integridad de la membrana plasmática, del acrosoma y los parámetros de integridad del ADN fueron significativamente más altos ($P < 0,05$) con DMF al 5% que los otros niveles de crioprotectores y combinaciones de GLY y DMF. A partir del presente estudio, se infiere que la combinación de crioprotectores a diferentes concentraciones GLY y DMF (a 2.5 y 1%) tampoco pudo mostrar una mejor mejora en comparación con el crioprotector único, es decir, DMF 5% en varias características seminales posteriores a la descongelación del semen de sementales indígenas. El DMF a una concentración del 5% proporcionó una mejor protección a la membrana plasmática y conservó la integridad del

acrosoma y el ADN de los espermatozoides. Por lo tanto, se puede concluir que el DMF al 5% se puede utilizar para la criopreservación del semental indígena con una mejor preservación de la calidad seminal.

- **La dimetilformamida mejora las características in vitro de los espermatozoides de sementales descongelados, reduciendo el daño subletal (78).**

En el experimento se utilizaron un total de 42 eyaculados; seis eyaculados por semental, obtenidos de siete sementales puros españoles (PRE), se fraccionaron y congelaron en medios de congelación con diferentes concentraciones y combinaciones de crioprotector (CPA): (i) Cáceres (diluyente a base de leche desnatada) que contenía un 2,5% de GLY (2,5GLY-2,5% DMFA) y (iv) diluyente suplementado con un 4% DMF (4% DMFA). Después de al menos 4 semanas de almacenamiento en nitrógeno líquido (LN), las pajuelas se descongelaron y el semen se analizó mediante análisis de espermatozoides asistido por computadora y citometría de flujo (arquitectura lipídica de membrana (Merocianine 540), integridad y daño subletal (YoPro-1) y potencial de membrana mitocondrial (JC-1)). Después de la descongelación, se observaron mejores resultados en las muestras congeladas en DMFA al 4% o en combinaciones de 1,5%GLY -2,5% DMFA, de hecho, la motilidad total aumentó en un 16% en el grupo de DMFA 4% en comparación con 2,5%GLY ($P < 0,05$). Además, hubo un aumento en el porcentaje de células espermáticas móviles progresivos en el grupo 1,5%GL-2,5%DMFA (9,8% 2,5GLY vs 19% en el grupo 1,5%GLY frente a 36,7% en el grupo de 4% de DMFA ($p < 0,05$). La arquitectura lipídica de la membrana no se vio afectada por ninguno de los crioprotectores probados, mientras que las muestras congeladas en 4% de DFMA tenían un menor porcentaje de mitocondrias con menor potencial de membrana. Se concluye que el DMFA mejora el resultado de la criopreservación de espermatozoides de sementales, principalmente reduciendo el daño crioletal subletal.

- **Parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos (79).**

El objetivo fue evaluar el efecto del colesterol y la DMF sobre la supervivencia de las células espermáticas de caballos Criollos Colombianos. Se recolectó semen 10 caballos y se congeló con igual protocolo, con variaciones del ACP (glicerol 5% o DMF 5%) y con la adición o ausencia de colesterol como modificador de membrana (1,5 mg ciclodextrinas con colesterol por cada 120×10^6 células). La supervivencia se evaluó estimando movilidad mediante el software SCA. La vitalidad e integridad de membrana posdescongelación se estimó usando eosina-nigrosina y test HOST respectivamente. Se incubó el semen con el colesterol, tuvo un aumento significativo del porcentaje de movilidad total y progresiva, en la velocidad de y el porcentaje de espermatozoides rápidos y una disminución del porcentaje de espermatozoides con movilidad lenta. Adicionalmente se incrementó el porcentaje de espermatozoides vivos y con integridad de membrana ($p < 0.05$). La DMF como agente crioprotector, mejoró todos los parámetros evaluados al ser comparada el GLY ($p < 0.05$). Ambos procedimientos mejoraron los parámetros evaluados debido a efectos aditivos del crioprotector y del modificador de membrana, pero no hubo interacción entre estos dos factores.

- **Crio preservación de semen de caballo Peruano de Paso utilizando Dimetilacetamida como agente crioprotector (80).**

Concluyen que las concentraciones finales estudiadas de 3, 4 y 5% de dimetilacetmida que se usaron ACP para la criopreservación del semen equino de la raza Caballo Peruano de Paso, tienen similares porcentajes de motilidad, vitalidad e integridad funcional de membrana plasmática.

- **Evaluación de la función de las membranas espermáticas equinas: Efecto de la ciopreservación (81).**

Los espermatozoides tienen varios compartimentos funcionales, todos los cuales deben evaluarse para pronosticar la eficacia reproductiva del macho. La carga primaria del espermatozoide es su ADN, ya que constituye el genoma haploide complementario al del ovocito, y la fusión de ambos gametos genera el genoma diploide singular del potro. Es probable que las anomalías del ADN no sean completamente compensables, a pesar de la capacidad del ovocito para la reparación parcial, y por lo tanto se cree que tienen un impacto significativo en las tasas elevadas de mortalidad embrionaria temprana encontradas en esta especie. Por el contrario, las membranas espermáticas deben permanecer intactas y funcionando para facilitar la fertilización del ovocito in vivo. En consecuencia, el examen del ADN y las membranas espermáticas ha adquirido importancia en la evaluación seminal en los últimos años. Un examen exhaustivo de las membranas espermáticas es crucial para comprender la creación, la respuesta acrosómica y la fusión con la zona pelúcida y el oolema, todos los cuales son pasos fundamentales en la fertilización.

- **Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen refrigerado de Caballo Peruano de Paso. Reporte preliminar (82).**

Esta investigación cuyo objetivo fue evaluar el impacto del enfriamiento en la viabilidad, integridad acrosómica y actividad mitocondrial del semen de Caballo peruano de Paso (CPP). Se obtuvieron dos muestras de semen CPP, se filtraron y se centrifugaron para eliminar el plasma seminal. Posteriormente, se diluyeron en leche con glucosa UHT y se almacenaron a 5°C durante 48 horas. Se evaluó a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración. La viabilidad e integridad acrosómica se evaluaron utilizando lectina de *Pisum sativum* y yoduro de propidio (FITC-PSA / PI), mientras que la actividad mitocondrial se midió utilizando Mitotracker Red CMXRos®. Se realizaron mediante citometría de flujo. La proporción de células espermáticas vivas con acrosomas intactos disminuyó progresivamente a lo largo de 0, 24 y 48 horas de refrigeración (55%,

42% y 31%, respectivamente), aunque la actividad mitocondrial bajó notablemente a las 24 horas (del 67% al 34%) y se mantuvo relativamente constante a las 48 horas (29%). Se establece que la calidad del eyaculado CPP disminuye progresivamente durante el enfriamiento; sin embargo, se requieren repeticiones adicionales.



CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Localización

A. Espacial

El presente estudio se llevó a cabo en el Fundo Los Amigos, ubicado en el anexo de Yumina, distrito Characato, provincia y departamento de Arequipa para la fase de recolección de muestras seminales, mientras que el procesamiento de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones de DIAGNOVET SAC, ubicado en Av. Argentina No. 814 Urb. Progresistas. Paucarpata, Arequipa.

B. Temporal

Se desarrolló entre diciembre del 2023 y marzo 2024.

3.1.2 Materiales biológicos

- 04 padrillos de la Raza Peruana de Paso de 4 a 5 años.

3.1.3 Materiales de laboratorio

- Microscopio óptico
- Sistema de Contraste de fases
- Termoplatina
- Cámara de microscopio Amscope® USA
- Centrifuga Tubos de 50 cc horizontal Clay Adams® USA
- Refrigerador con registro de temperatura
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas de Pasteur
- Crioviales
- Eosina Nigrosina

- Glutaraldehido 2%
- Solución Salina Formolada
- Solución de Fructosa 150 mOsm/ Lt (1.351 g de D-fructosa/100 ml)
- Citrato de Sodio 150 mOsm (0.375 g de citrato de sodio /100ml)
- Aceite de inmersión
- Alcohol polivinilico
- Nitrógeno Líquido (NL)
- Termocupla
- Rampa de humeo
- Caja de tecknopor
- Pinza portapajillas
- Cortador de pajillas
- Cronometro
- Osmometro
- Peine para semen
- Pajillas de 0,5 cc
- Rotulador de pajillas
- Incubadora 37 C
- Tubos de ensayo 9 x 100
- Gradilla para pajillas

3.1.4 Materiales de campo (colección)

- Cámara digital
- Vagina para equinos tipo artificial tipo Missouri
- Fundas para vagina artificial de equino
- Termómetro digital de barra metálica
- Embudo
- Lubricante
- Bolsas colectoras de semen WilPak
- Filtro para semen
- Protector de receptáculo de semen
- Hervidor de agua

- Baño de María
- Microscopio de campo
- Lubricante no espermicida
- Dilutor de semen Equipro® Minitub Alemania
- Equitainer®
- Baño de María
- Acondicionador de vagina artificial de equino

3.1.5 Equipos y maquinarias

- Celular
- Congelador de semen
- Contador de semen

3.1.6 Otros materiales

- Camioneta
- Libreta de anotaciones
- Reloj-cronometro

3.2 Métodos

3.2.1 Muestreo

a. Universo

Se trabajó con 04 padrillos de la raza Peruano de Paso

b. Tamaño de la muestra

Se trabajó con 04 padrillos de la raza Peruana de Paso.

c. Procedimiento de muestreo

No se realizó ya que se trabajó con toda la muestra. Así mismo es un trabajo de investigación de nivel relacional.

3.2.2 Formación de unidades de estudio

	Padrillo Nro. 1	Padrillo Nro. 2	Padrillo Nro. 3	Padrillo Nro. 4
Eyaculado N° 1				
Eyaculado N° 2				
Eyaculado N° 3				
Eyaculado N° 4				

3.2.3 Métodos de evaluación

a. Metodología de la experimentación

- **Recolección de semen**
 - Montaje de vagina artificial
 - Llenado con agua tibia de la vagina artificial a 45 °C
 - Lubricado de la vagina con lubricante no espermicida
 - Manejo del padrillo
 - Lavado del pene del padrillo
 - Manejo de la yegua señuelo
 - Monta y desvió del pene del caballo
 - Colocación de la vagina al pene del caballo
 - Verificación de flujo de la eyaculación
 - Retiro del filtro de semen con el gel
 - Transporte de la bolsa de semen para laboratorio
- **Evaluación seminal pre criopreservación**
 - Macroscópica: color, volumen, pH, apariencia
 - Microscópica: motilidad, concentración, morfología
 - Viabilidad: pruebas hiposmotica.
- **Centrifugado**
 - Adición del dilutor de semen.
 - Centrifugado a 800 g x 12 minutos en tubos Falcon x 50 cc.
 - Decantación del sobrenadante por sifonaje.

- Evaluación de la concentración espermática con espectofotometro
- **Adición del dilutor con el agente crioprotector**
 - Dilución 1:1 lentamente
 - Mezclado
- **Congelación de pajuelas**
 - Rotulado de pajillas
 - Llenado de pajillas
 - Sellado de pajillas
 - Se dejó una burbuja de aire a las pajillas
 - Se estabilizó mediante refrigeración a 5 °C durante 20 minutos.
 - Se preparo una depósito de tecknopor con una marca a la altura para el NL a 4 cm y la rampa de pajillas se colocó a de 6 cm.
 - Se ordenaron de las pajillas en la rampa metálica para el proceso congelación por humeo
 - El humeo con nitrógeno líquido se realizó por un lapso de 12 minutos.
 - Culminado el humeo de proceder al volteo en el nitrógeno líquido.
 - Se guardaron en el termo de nitrógeno líquido.
- **Evaluación seminal pos criopreservación**
 - La descongelación de las pajillas de semen se realizó sumergiéndolas en un termo descongelaador con agua a 52°C durante 10 segundos.
 - Inmediatamente después se pasó a un baño maría a 37°C durante 30 segundos (111).
 - Se procedió a secar la pajilla y realizar un movimiento volteo rápido para que la burbuja de aire se desplace al lugar de corte en el extremo.
 - Cortamos de la pajilla y pasamos a criovial temperado.
- **Evaluación microscópica: motilidad, concentración, morfología**
 - La motilidad se evaluó de forma subjetiva.

- El semen fue colocado en portaobjetos con su respectivo cubreobjetos temperados 37°C y se evaluaron los espermatozoides a 400x (97), se estableció el porcentaje (%) de células espermáticas con movimiento progresivo de avance.
- La concentración del semen fue valorada en forma objetiva, mediante la técnica de espectrofotometría indirecta, relacionando la absorción o dispersión de la luz.
- La morfología de la célula espermática se determinó mediante la fijación de una muestra de semen posdescogelamiento en portaobjetos con solución de glutaraldehído y el posteriormente se realizó el conteo de espermatozoides mediante microscopia de contraste de fases (98, 99, 100, 101).
- **Funcional: pruebas hiposmótica.**

Prueba de endosmosis, conocida también como hinchazón hipoosmótica (HOST) (Hypo Osmotic Swelling Test), detallada por Jeyendran y col. (102; 103).

 - Empleamos una solución de 150 mOsm / L citrato de sodio y soluciones de fructosa (0.375 g de citrato de sodio dihidratado y 1.351 g de D-fructosa en 100 ml de agua destilada) (101).
 - Se estableció el porcentaje (%) de espermatozoides que no sufrieron daño a su membrana plasmática y sufren de enrollamiento de cualquier grado de la cola tras la incubación en un medio hipoosmótico.
 - Se procedió a incubar en baño maría 37 °C, la solución hipo osmótica durante 10 minutos.
 - Colocamos 100 µl de semen en 1 ml de una solución hipo osmótica (150 mOsm/Kg).
 - Se incubo la mezcla de semen con la solución hipo osmótica por 30 minutos a 37 °C en la incubadora
 - Tras la incubación extrajimos una pequeña fracción de 10 uL de la solución
 - Se extendió al portaobjetos limpio.
 - Se fijo una muestra en una solución al 0.2% de glutaraldehído.

- A razón 1: 1
- Procedimos a cubrir con un cubreobjetos.
- Posteriormente observamos al microscopio
- El montaje fue evaluado con un microscopio óptico a 400x.
- Las células espermáticas que presenten la cola hinchada resultado de la gradiente por osmolaridad se consideraron como intactas de la membrana plasmática.
- Contamos 200 células espermáticas por portaobjetos
- Los hallazgos se expresaron en porcentaje de células espermáticas con reacción positiva a la prueba (% HOS+).

3.2.4 Variable de respuesta

- a. **Variable independiente (variable de estudio):** Eyaculado fresco de Caballo de la raza Peruano de Paso
- b. **Variable dependiente (variable relacionada):** Semen descongelado con agente crioprotector penetrante. DMF o G.
- c. **Operacionalización de las variables**

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
VARIABLE INDEPENDIENTE EYACULADO FRESCO DE PADRILLO DE LA RAZA PERUANA DE PASO	EVALUACION MICROSCOPICA	MOTILIDAD CONCENTRACION MORFOLOGIA	Microscopia Espermatocitometria Glutaraldehido	Microscopio Cámara de Neubauer Microscopia
	EVALUACION FUNCIONAL	PRUEBAS OSMOTICAS	Test HOST	Osmómetro
VARIABLE DEPENDIENTE SEMEN DESCONGELADO CON ADICION DEL AGENTE CRIOPROTECTOR PENETRANTE	DIMETILFORMAMIDA 1%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmolmetro/Microscopio
	2%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio

VARIABLE	INDICADOR	SUB INDICADOR	TECNICA	INSTRUMENTO
	3%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio
	4%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmolmetro/Microscopio
	GLICEROL 1%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio
	2%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio
	3%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio
	4%	MOTILIDAD MORFOLOGIA VIABILIDAD	Microscopia Tinción supravital Test HOST	Microscopio Microscopio Osmómetro/Microscopio

3.2.5 Evaluación estadística

Los datos obtenidos, se analizaron inicialmente con una prueba para determinar su normalidad mediante una prueba de Shapiro Wilk (16 datos/evaluación), según el resultado se usó una prueba paramétrica, seguidamente con se realizó la comparación de sus medidas de tendencia central y de dispersión para cada uno de los crioprotectores DMG y G, así mismo se realizó el ANOVA y la comparación de medias de Tukey para múltiples grupos medias. Posteriormente se comparó el modelo mediante considerando los coeficientes de R^2 , R^2 Aj y el CV.

3.2.6 Diseño experimental

3.2.6.1 Unidades experimentales

Se considero a cada uno como padrillo, siendo una unidad experimental (4), las eyaculaciones de cada padrillo seleccionado serán consideradas como unidades de estudio (16).

3.2.6.2 Diseño de tratamientos

Al ser un estudio de nivel relacional, no existe tratamientos.

Las unidades de análisis estarán representadas por pajillas de 0,5 cc, rellenas con semen de equino proveniente de los eyaculados con agente crioprotector DMF y GLY las cuales contenían a una 250 millones de células espermáticas por centímetro cubico.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio nivel relacional, presenta: la búsqueda, explicación y análisis sistémico, minucioso y exhaustivo de los cimientos por una parte hipotéticos y el problema de investigación y por otro lado la explicación de las estrategias de la metodología en la realización de la presente estudio, con sus respectivo análisis de datos, normalidad, así como los resultados hallados y las discusiones respectivas del análisis de la Comparación de agentes crioprotectores DMF y GLY para mejorar la funcionabilidad espermática de semen criopreservado de caballos de la raza Peruano de Paso.

Se tomaron en cuenta una serie de acciones que involucran la revisión del marco referencial y el estado de la ciencia, así como el cotejo con los datos reportados existentes con nuestros datos obtenidos, procesamiento, cálculo y análisis con los estadísticos adecuados y resultados logrados acompañados de su significancia estadística.

La criopreservación es actualmente la única estrategia para la conservación a largo plazo del espermatozoide equino. Para obtener una supervivencia óptima de los espermatozoides después de la descongelación, es crucial seguir cuidadosamente cada paso del protocolo de congelación. En primer lugar, es necesario obtener y analizar exhaustivamente un eyaculado de espermatozoides de buena calidad (104).

La criopreservación del espermatozoide del caballo peruano de paso para su uso en programas de IA es de suma importancia para su promoción (84).

4.1. Motilidad de los espermios del eyaculado de los padrillos de CPP.

En la **tabla 1**. Podemos examinar los datos de motilidad espermática de las muestras recolectadas de semen ($n = 16$). La motilidad, ha sido considerada como un parámetro, considerado como señal de fecundidad en equinos (15).

Las células espermáticas adquieren movimiento durante el tránsito por el epidídimo (105) La movilidad del flagelo es influida tras la eyaculación y se modula durante el tránsito del espermatozoide a través del aparato reproductor de la hembra (106).

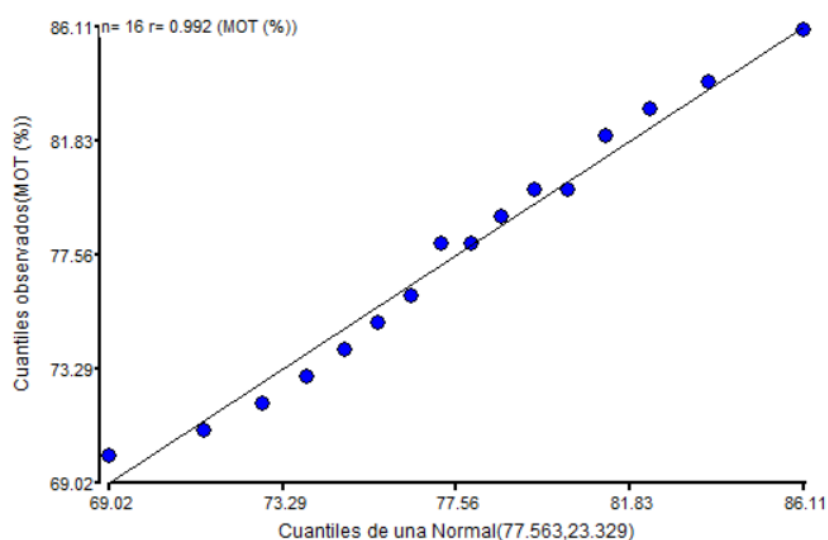
Esta transición significa alteraciones secuenciales significativas en las características de movilidad de las células espermáticas, lo que indica variaciones en el largo de onda flagelar (movimiento asimétrico) o modificaciones en el movimiento lateral de la cabeza (107), lo que sugiere que los espermatozoides deben acrecentar la movilidad para atravesar el tracto reproductor femenino, seguida de una hiperactivación espermática para alcanzar el sitio de fertilización y penetrar en la membrana del ovulo (88).

Tabla 1.
Motilidad de espermios del eyaculado del CPP

	Padrillo No. 1	Padrillo No. 2	Padrillo No. 3	Padrillo No. 4
Eyaculado No. 1	80	75	84	78
Eyaculado No. 1	78	71	80	72
Eyaculado No. 1	83	73	86	70
Eyaculado No. 1	79	74	82	76

En la **tabla 1**, observamos los resultados de la motilidad del semen fresco de 16 eyaculados ($n=16$), los cuales al someterse a pruebas de bondad de ajuste graficas como el QQ-Plot y la de prueba de Shapiro Wilk.

Figura 1.
QQ-Plot de la normalidad grafica de la movilidad de los espermios del eyaculado de CPP



En el QQ-Plot, de la **figura 1**, podemos observar que el $r=0,992$, lo que nos señalan que los datos de motilidad de los 16 eyaculados, siguen una distribución normal.

En la tabla 2, podemos ver que el resultado de la prueba de bondad de ajuste de SW es $p > 0,05$, con lo cual se rechaza la H_0 , de la población no corresponde a una distribución normal. Podemos ver que el p valor es 0,5976, con lo que se puede concluir que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 2.

Test de Bondad de Ajuste de Shapiro Wilk para la movilidad de espermios del semen fresco de CPP

Variable	n	Media	DE	W	P (Unilateral D
MOT (%)	16	77,56	4,83	0,94	0,5976

Para lograr éxito en el proceso de crioconservación espermática del eyaculado de caballos, en primer lugar, es necesario obtener y analizar exhaustivamente un eyaculado de espermia de buena calidad (104), para lo cual evaluamos en la presente investigación la motilidad espermática del semen fresco.

Según Varner (15), la motilidad se ha utilizado tradicionalmente para determinar la capacidad fertilizadora del semen del caballo. La capacidad fecundante y la movilidad espermática se desarrollan simultáneamente, por lo que se han empleado como indicadores indirectos del potencial fecundante de los espermatozoides (108; 109). El caballo posee un tipo distintivo de movimiento del espermia de manera circular o semicircular, debido fundamentalmente a la inserción abaxial del componente intermedio en la cabeza del espermia, que no se consideraría progresivo en otras especies (110).

En la **tabla 3**, podemos ver las medidas de centralidad y de dispersión de la movilidad de las células espermáticas del eyaculado, con una media de 77.56% +/- 4.83%, con un valor máximo de 86% y un valor mínimo de 70%. Según gran número de investigadores, un eyaculado de calidad debe contener al menos un 60% de espermia migratorio progresivo en el eyaculado (112).

A pesar de las importantes complicaciones económicas y de bienestar asociadas con una mala función testicular, las tendencias en las poblaciones equinas actuales son indeterminadas (94).

Hernández et al. (113) y Gutiérrez et al., (2014) (114) señalan que el porcentaje de células espermáticas con movilidad progresiva en semen fresco se asocia con una alta calidad, por lo que se considera que un garañón fértil debe presentar $\geq 60\%$ de motilidad progresiva. Característica fundamental para proceder al congelamiento de dosis seminales. El porcentaje de células espermáticas con movilidad progresiva en semen fresco se asocia con una alta calidad de los espermatozoides, por lo que se considera que un garañón fértil debe presentar $\geq 60\%$ de motilidad progresiva (112).

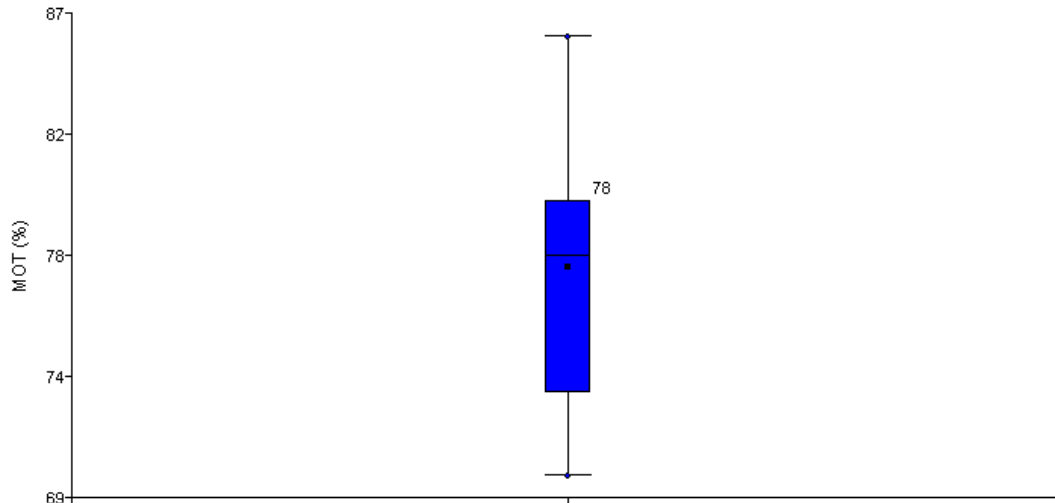
Se recomienda que la evaluación de la movilidad progresiva sea inmediatamente después de la colecta para garantizar un valor preciso (114). La proporción estándar de motilidad progresiva es del 75%, con un rango del 60 al 95% (115). Durante la evaluación de la movilidad, debe anotarse la cantidad de células espermáticas que exhiben movimiento de tipo oscilante y progresivo hacia el frente (117).

Todas las razas, excepto la frisona durante la era no reproductiva, tuvieron tasas de movilidad crecientes superiores al 70%. No hay distinción entre las razas con respecto a los períodos reproductivos y no reproductivos. Las razas Holsteiner, española y árabe exhiben los porcentajes más altos de motilidad progresiva. La árabe no crea gel en su eyaculación, lo que puede explicar una mayor motilidad. Múltiples factores influyen en la motilidad progresiva, la temperatura, las variaciones osmóticas, el manejo inadecuado de la eyaculación, el diluyente, el intervalo entre la recolección y evaluación del semen, la edad y la presencia de antibióticos en los diluyentes (118).

Tabla 3.

Medidas de resumen para la motilidad de espermios del eyaculado de CPP.

Resumen	MOT (%)
N	16,00
Media	77,56
D.E.	4,83
Var (n -1)	23,33
E.E.	21,87
CV	1,21
Min	6,23
Max	70,00
Mediana	86,00
Q1	73,00
Q3	80,00
Asimetría	0,07
Kurtosis	-1,06

Figura 2.**Blox-Plot de las medidas de resumen de la movilidad de los espermios en el eyaculado**

En la **figura 2**, podemos ver en el diagrama de caja y bigotes, de los valores de motilidad espermática en el eyaculado fresco, la muy baja dispersión en la distribución de los datos ya que la media y mediana tienen valores muy cercanos, y muy ligera asimetría a la derecha así mismo el Q1 es 73% y el Q3 80%, sin presencia de datos atípicos y platicurtica.

En el semental, la motilidad progresiva se utiliza como una estimación general de la fertilidad, con menos del 50% de movilidad progresiva en el semen crudo o menos del 10% de movilidad progresiva dos horas después de la recolección siendo un indicador de subfertilidad potencial (119). Sin embargo, la fertilidad de los sementales puede ser pobre incluso con una población altamente móvil (120) y, por lo tanto, es fundamental comprender otras anomalías comunes de los espermios.

La Asociación de Teriogenología americana. ha establecido reglas para el examen del semen en prospectos de sementales. Se recomienda que el semen mantenido a temperatura ambiente conserve un 10% de su motilidad progresiva a las 6 y 24 horas para semen puro y diluido, respectivamente (121).

La motilidad progresiva de los espermatozoides (MOTP, por sus siglas en inglés) es una característica crucial para predecir la infertilidad del semental (122); vital para penetrar en la zona pelúcida y determinar la capacidad de fertilización (123).

Es un parámetro predictivo que puede utilizarse para vigilar las tendencias de la salud y la función reproductivas. Dentro de la industria equina, se han propuesto valores umbral de MOTP para la predicción de la fertilidad (124;125). A lo largo de la literatura, se han reportado lecturas por debajo de los umbrales propuestos en sementales, incluidos aquellos definidos como fértiles (128; 129; 130).

La calidad subóptima del eyaculado de los sementales es motivo de gran preocupación para el sector de la cría. Es vital realizar más investigaciones que diluciden las tendencias temporales para iniciar un enfoque holístico de la protección de la salud y la función reproductiva de los equinos.

Teniendo en cuenta múltiples covariables predeterminadas, el MOTP disminuyó significativamente entre 1984 y 2019, con una disminución general y anual del 33,51 y el 0,96%, respectivamente. Las tendencias adversas de MOTP dentro de esta población equina son motivo de gran preocupación para el sector mundial de la cría. Dado que la función reproductiva de los sementales es fundamental en la capacidad de producir una progenie exitosa, los resultados son preocupantes para la sostenibilidad y la economía de la industria equina en general.

La consistencia de las tendencias a través de múltiples análisis de sensibilidad proporciona evidencia sólida para respaldar la disminución de MOTP sugieren que una mayor proporción de sementales corren el riesgo de sufrir una reducción de la función testicular, lo que supone una grave preocupación económica (131), sanitaria y de bienestar para la industria de la cría. El PMOT se correlaciona significativamente con la tasa de fertilización *in vitro* (123).

Tabla 4.

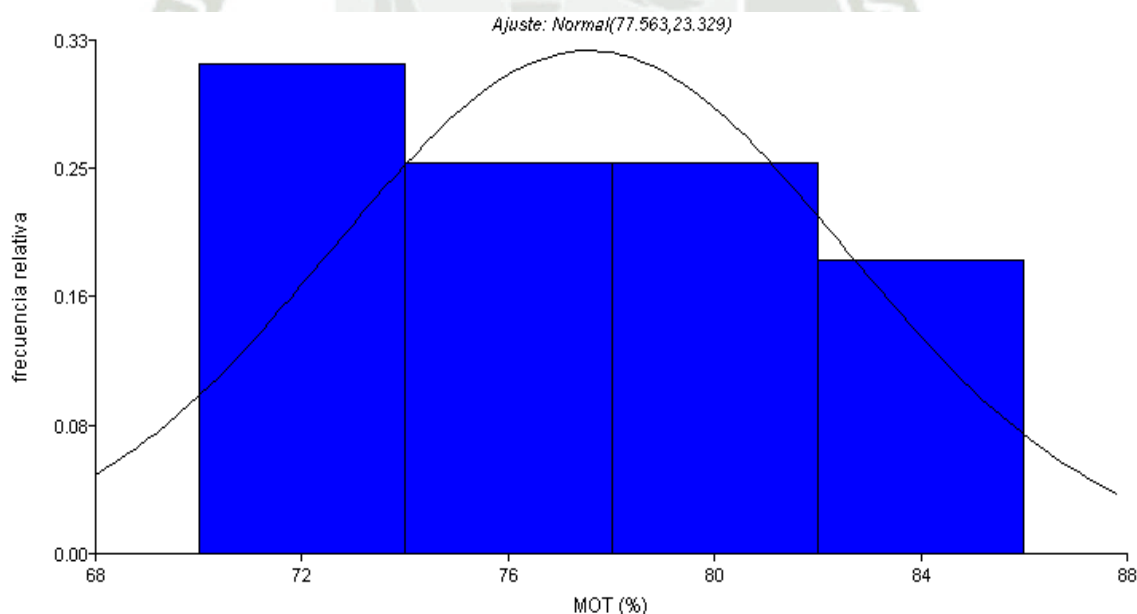
Distribución de frecuencias para la movilidad de espermios en el eyaculado de CPP

En la tabla 4, podemos ver la distribución de frecuencias en 4 clases según la regla de Sturges, siendo la clase 1, con un promedio de 72% de motilidad espermática, la que presenta mayor número de muestras evaluadas.

Variable	Clase	LI LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
MOT (%)	1	(70,00 – 74.00)	72,00	5	0,31	5	0,31
MOT (%)	2	(74,00 – 78.00)	76,00	4	0,25	9	0,56
MOT (%)	3	(78,00 – 82.00)	80,00	4	0,25	13	0,81
MOT (%)	4	(82,00 – 86.00)	84,00	3	0,19	16	1.00

Figura 3.

Histograma de la movilidad de espermios de CPP



El histograma de la **figura 3**, presenta un solo pico correspondiente al 72% de motilidad espermática, con una dispersión entre 72 y 84% de motilidad, un ajuste casi normal.

En consecuencia, la motilidad de los espermios es un factor crucial para considerar

en la determinación de la calidad seminal. En consecuencia, históricamente se ha considerado como una medida del potencial fertilizante de la eyaculación del caballo (15).

Algunos escritores afirman que el desarrollo de la capacidad de fertilización y la movilidad de los espermios ocurre simultáneamente, por lo tanto, se ha utilizado como indicador indirecto del potencial de fertilización (109; 110).

De acuerdo con la especie animal exhibe un patrón de movimiento distinto, influenciado por muchas características de los espermatozoides, como las dimensiones de la cabeza, el largo de la cola y la cadencia batido de la cola , entre otras (124).

El caballo tiene una forma distintiva de motilidad espermática circular o semicircular, atribuible principalmente a la inserción abaxial del componente intermedio en la cabeza espermática, que no se consideraría progresiva en otras especies (123).

Similar a lo que sucede con la evaluación morfológica de los espermatozoides, no hay acuerdo sobre los valores normativos de la motilidad espermática en un semental viable; no obstante, la mayoría de los estudios afirman que un semen de calidad debería exhibir valor iguales o superiores al 60% de espermios que demuestren motilidad progresiva (112).

Hay muchos de factores, tanto de inicio extrínseco, que afectan al movimiento espermático de una muestra. Entre ellos, destacamos la frecuencia de recogida (125; 126), el uso y el tipo de diluyentes para su evaluación (112), el tiempo entre la recogida y la evaluación, la temperatura o el uso de antibióticos y su presencia en los diluyentes (127; 128). Como factores intrínsecos y la raza de los animales estudiados (129; 130; 132; 120), las alteraciones de origen testicular (133,134), epididimario (135) o prostático (136).

La motilidad y la calidad de las células espermáticas disminuyen con la edad del semental y la preservación del espermatozoide, pero no se han explicado los mecanismos del déficit funcional.

En cuanto a las diferencias entre las razas de caballos, el caballo español presenta una mayor velocidad media de trayectoria, velocidad curvilínea y frecuencia de

cruzamiento en comparación con el caballo árabe. El esperma del caballo español era rápido, pero el del caballo árabe era más lineal.

La hélice mitocondrial es el grupo principal de orgánulos responsables de la motilidad activa y el metabolismo en el espermatozoide. El número de giros mitocondriales en la pieza media de los espermatozoides equinos varía entre 40 y 50, y se ha demostrado que su organización, o más específicamente una organización interrumpida, desempeña un papel en la fertilidad de los sementales a través de la producción localizada de ATP para el movimiento flagelar de los espermatozoides (137; 138; 139).

De hecho, se sabe que la función mitocondrial, que puede ser aproximada por el potencial de la membrana mitocondrial y la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) se correlaciona positivamente con la función general de los espermatozoides (139; 140; 141; 142).

4.2 Morfología normal espermática de semen fresco de los padrillos.

En el **Tabla 4**. Podemos observar los valores de morfología normal espermática de las muestras recolectadas de semen (n = 16).

El impacto significativo de los rasgos morfológicos normales de los espermios viables en los porcentajes de retención del ciclo inicial sugiere que esta evaluación del semen es indicativa de la eficacia reproductiva futura del equino reproductor. La persona que recolecta y manipula el semen, si son distintos, deben asegurarse de que todo el equipo en contacto con la eyaculación se mantenga a 37 ° C, ya que incluso pequeñas fluctuaciones de temperatura podrían influir negativamente en los espermatozoides y producir resultados inexactos (133).

La longitud de los espermatozoides equinos desde la cabeza hasta la cola es de aproximadamente 60 μm (134). Un espermatozoide consta de tres componentes principales: un tocado, una pieza media y una cola que están completamente encapsulados por una membrana plasmática (144).

La cabeza espermática presenta una forma alargada y ovalada que también es relativamente plana, con alguna variación individual (145, 146, 147)

Está formada por el acrosoma, que cubre la porción anterior de la cabeza del espermatozoide y tiene enzimas de tipo hidrolítico que se liberan para que el espermatozoide penetre en un ovocito; la lámina postacrosómica y el núcleo (144).

Además, se teoriza que las proteasas e hidrolasas contenidas en el acrosoma desempeñan un papel en la penetración del complejo del cúmulo de ovocitos, además de la zona pelúcida (148; 149).

La lámina postacrosómica cubre el núcleo caudal, que contiene el genoma masculino altamente condensado (145, 144). Los rasgos específicos de la cabeza del espermatozoide incluyen una cabeza asimétrica característica, una cola insertada paraxialmente y un pequeño acrosoma relevante para otras especies (150).

La determinación de la morfología de los espermios es crucial para evaluar la salud reproductiva tanto en humanos como en animales. Después de la inseminación natural o artificial, el espermatozoide inicia un viaje desde el lugar de deposición hasta el lugar de fertilización. Sin embargo, solo un pequeño subconjunto de los espermatozoides depositados logra su objetivo: alcanzar y fertilizar el óvulo. Los factores involucrados en el control del transporte y la fertilización de los espermatozoides incluyen el entorno del aparato reproductivo femenino, las interacciones entre células, la expresión génica y los rasgos fenotípicos de los espermios. Se conocen algunos de los determinantes significativos de la fertilización (es decir, la motilidad o el estado del ADN), pero muchos rasgos de los espermatozoides aún son indescifrables. Un ejemplo es la influencia de las dimensiones y la forma de los espermatozoides en el transporte dentro del tracto genital femenino hacia el ovocito. Las asociaciones biofísicas entre el tamaño y la motilidad de los espermios pueden influir en la progresión de los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino, pero siguen existiendo incertidumbres sobre cómo la morfología de los espermatozoides influye en el proceso de fertilización, y si solo las dimensiones de los espermatozoides por sí mismas están involucradas. Además, tales explicaciones no permiten la posibilidad de que el tracto femenino sea capaz de distinguir los espermatozoides fértiles en base a su morfología, como parece ser el caso de las propiedades bioquímicas, moleculares y genéticas (151).

Por el contrario, es elíptica en el caballo (112). Las dimensiones son 6,62 μm de largo y 3,26 μm de ancho (152; 112). El eyaculado del caballo tiene más del 20% de anomalías en reproductores fértiles (153), atribuibles, a la limitada selección basada en la capacidad reproductiva que ha sufrido los equinos, a diferencia de rumiantes y cerdos.

El porcentaje de células espermios que exhiben morfología normal en el eyaculado de un caballo es muy variado. La Sociedad Estadounidense de Reproducción Animal (154) aconseja seleccionar sementales que logren un mínimo de 75% de tasas de gestación cuando cubran 40 o más yeguas, o que superen las 120 yeguas cuando se utiliza la IA. Sugiere un porcentaje estándar de espermios que exhiben morfología normal por colecta, estableciendo una evaluación favorable de los eyaculados cuando contienen como mínimo mil millones de células espermáticas con morfología adecuada y motilidad progresiva, luego de la recolección y evaluación de dos eyaculados con una hora de diferencia (145;155).

Por el contrario, otros investigadores afirman que una muestra de semen se considera aceptable cuando contiene al menos 60% de células espermáticas exhiben una morfología adecuada, ya que se anticipa que una eyaculado con menos del 50% demuestra un potencial reproductivo disminuido (135).

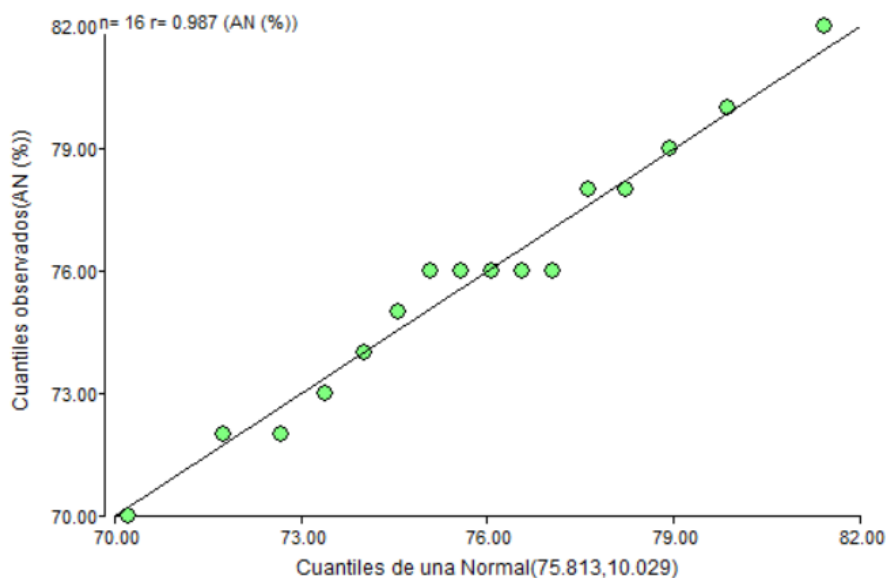
Tabla 5.

Morfología normal de los espermios del eyaculado de CPP

	Padrillo No. 1	Padrillo No. 2	Padrillo No. 3	Padrillo No. 4
Eyaculado No. 1	72	76	79	74
Eyaculado No. 1	76	72	76	76
Eyaculado No. 1	70	75	82	78
Eyaculado No. 1	78	73	80	76

Figura 4.

QQ-Plot de la normalidad grafica de la morfología normal de espermios del eyaculado de CPP



En el QQ-Plot, de la **figura 4**, podemos observar que el $r=0,987$, lo que nos señalan que los datos de motilidad de los 16 eyaculados, siguen una distribución normal.

En la tabla 6, podemos ver que el resultado de la prueba de bondad de ajuste de SW es $p > 0,05$, con lo cual se rechaza la H_0 , de la población no corresponde a una distribución normal.

Tabla 6.

Test de Bondad de Ajuste de Shapiro Wilk para la movilidad de espermios del eyaculado de CPP

Variable	n	Media	DE	W	P (Unilateral D)
MORF (%)	16	75,81	3.17	0.97	0,8711

En la **tabla 7**, podemos ver las medidas de tendencia central y de dispersión de la motilidad espermática, con una media de $75,81\% \pm 3,17\%$, con un valor máximo de 82% y un valor mínimo de 70% . Nuestros valores encontrados están por encima de los reportados (154) quienes recomiendan que como mínimo para la elección de un semental, este debe presentar al menos un 75% de normalidad morfológica.

La morfología espermática determinada en esta investigación, mostro un valor medio similar a los obtenidos por (156), inferiores a los registrados por (157) y muy por encima a los obtenidos por otros autores (115; 148; 159) en reproductores con fertilidad demostrada. Estas desemejanzas pueden estar causadas por la técnica de recolección (160), el tipo de tinción para la citología (152; 157), el intervalo de recogida (11), el tiempo del periodo de excitación anterior a la colección (126), y también la edad de los sementales (160).

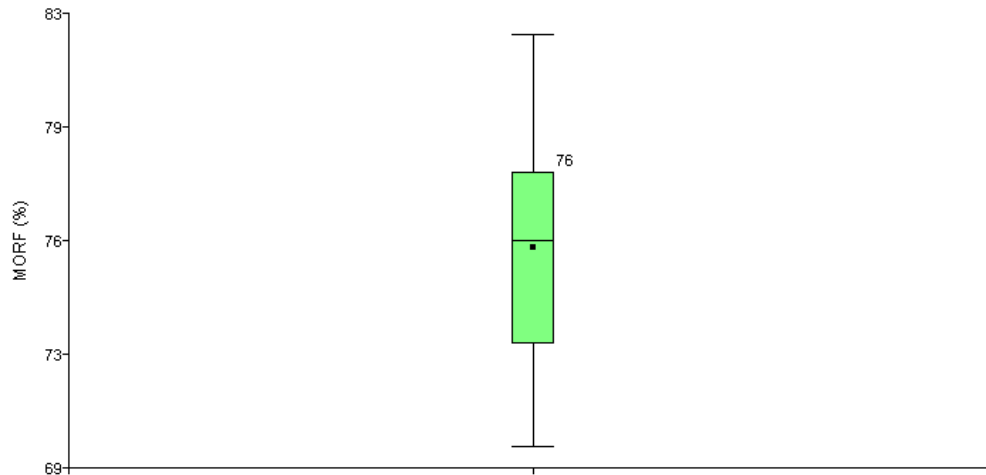
Estas variaciones en los parámetros reportados de motilidad quizás podrían deberse a la evaluación subjetiva por parte de los investigadores, en aquellos casos donde emplearon equipos computarizados, podría haber una mayor diferencia. Así mismo influye probablemente la raza.

Tabla 7.

Medidas de resumen para la morfología de espermios del eyaculado de CPP.

Han surgido varios procedimientos de laboratorio nuevos para evaluar la morfología y funcionalidad del acrosoma de las células espermáticas, pero no han reemplazado por completo al examen morfológico tradicional (151; 152).

Resumen	MOT (%)
N	16,00
Media	75,81
D.E.	3,17
Var (n -1)	10,03
E.E.	0,79
CV	4,18
Min	70,00
Max	82,00
Mediana	76,00
Q1	73,00
Q3	78,00
Asimetría	0,07
Kurtosis	-0,48

Figura 5.**Blox-Plot de las medidas de resumen de la morfología de espermios del eyaculado de CPP**

En la **Figura 5**, podemos ver en el diagrama de caja y bigotes, la muy baja dispersión en la distribución de los datos ya que la media y mediana tienen valores muy cercanos, y muy ligera asimetría a la derecha así mismo el Q1 es 73% y el Q3 78%, sin presencia de datos atípicos y platicurtica.

En la **tabla 8**, podemos ver la distribución de frecuencias en 4 clases según la regla de Sturges, siendo la clase 2, con un promedio de 74,50 % de motilidad espermática, la que presenta mayor número de muestras evaluadas.

El análisis morfométrico facilita actualmente la caracterización de diversas morfologías espermáticas y su correlación con la fertilidad. Los recientes progresos en las metodologías y equipamientos de análisis por imágenes permiten el examen individual de las propiedades morfológicas de los espermatozoides, revelando así la heterogeneidad celular presente en los eyaculados de mamíferos y entre los individuos (163).

En consecuencia, la evaluación automatizada de la morfología espermática ha identificado y caracterizado eficazmente estos grupos celulares en varias especies animales (164; 165, 166, 167, 168).

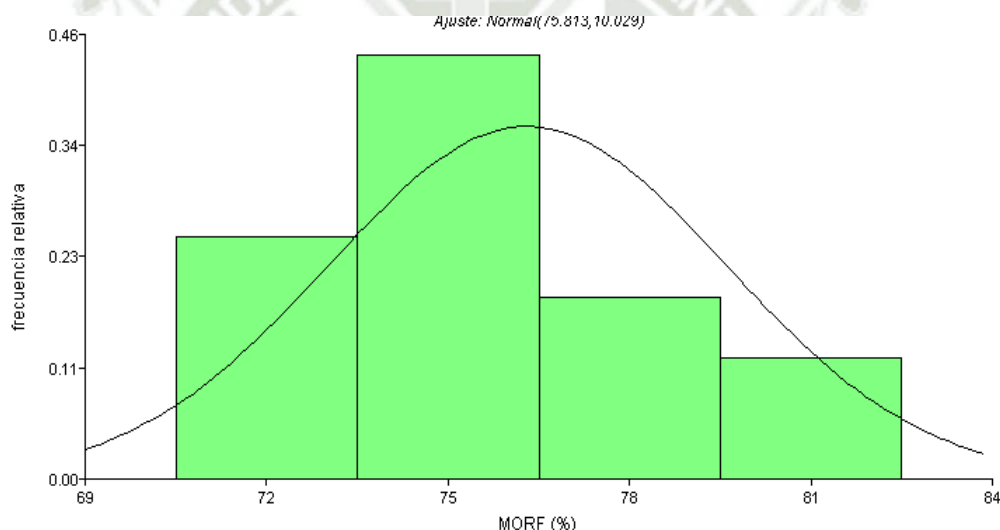
Tabla 8.

Distribución de frecuencias para la morfología espermática del semen fresco de caballo Peruano de Paso

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
MORF (%)	1	(70,00 – 73,00)		71,50	4	0,25	4	0,25
MORF (%)	2	(73,00 – 76,00)		74,50	7	0,44	11	0,69
MORF (%)	3	(76,00 – 79,00)		77,50	3	0,19	14	0,88
MORF (%)	4	(79,00 – 82,00)		80,50	2	0,13	16	1,00

Figura 6.

Histograma de la morfología de espermios del eyaculado de CPP



El histograma de la **figura 6**, presenta un solo pico correspondiente al 75% de morfología espermática, con una dispersión entre 72 y 81% de morfología normal, y presenta un ajuste normal.

De los enfoques descritos, el análisis de conglomerados es la técnica estadística multivariante predominante empleada para identificar y caracterizar subpoblaciones morfológicamente diferentes, según lo determinado por los hallazgos derivados de los sistemas CASA. En consecuencia, esta forma de análisis estadístico se ha empleado eficazmente en otras especies, incluido el caballo (146; 166).

Un problema principal con los estudios morfométricos y cinéticos es la gran cantidad de variables inherentes a ambos sistemas, lo que complica la interpretación de los datos y disminuye la efectividad (167).

4.3 Viabilidad espermática de semen fresco de los padrillos.

En la **tabla** , podemos observar los valores de viabilidad espermática de las muestras recolectadas de semen (n = 16).

Evaluar la viabilidad de los espermios permite determinar el estado de la membrana plasmática. Entre las metodologías más empleadas esta la tinción de eosina/nigrosina, en la cual con ayuda de un microscopio de campo claro se contabiliza los espermios permeables y los no permeables a estos colorantes (169).

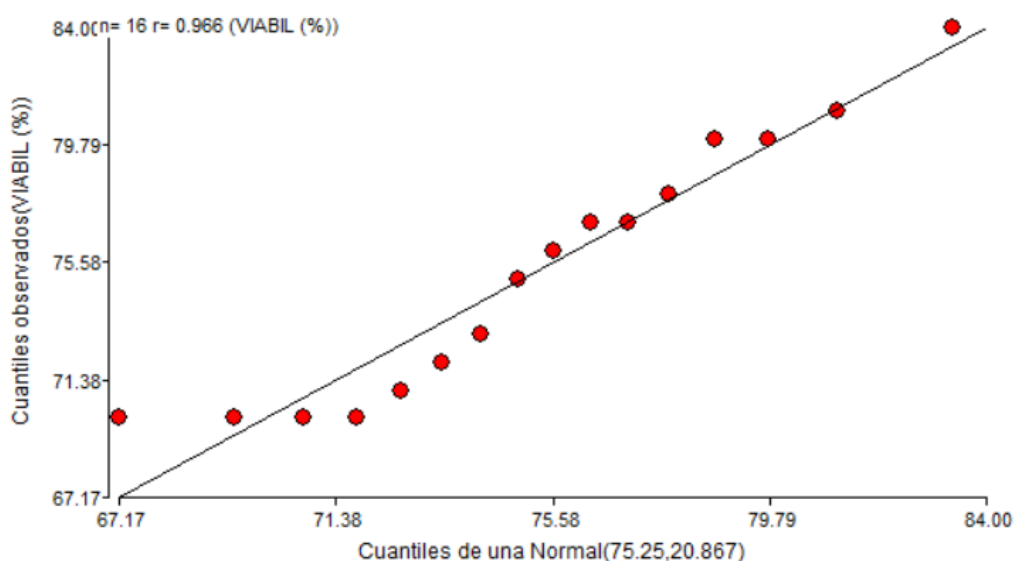
Tabla 9.

Viabilidad espermática del semen fresco

	Padrillo No. 1	Padrillo No. 2	Padrillo No. 3	Padrillo No. 4
Eyaculado No. 1	77	73	81	76
Eyaculado No. 1	75	70	78	70
Eyaculado No. 1	80	70	84	70
Eyaculado No. 1	77	71	86	72

Figura 7.

QQ-Plot de la normalidad grafica de la viabilidad espermática del semen fresco



En el QQ-Plot, de la **figura 7**, podemos observar que el $r=0,966$, lo que nos señalan que los datos de motilidad de los 16 eyaculados, siguen una distribución normal.

En la **tabla 10**, podemos ver que el resultado de la prueba de bondad de ajuste de SW es $p > 0,05$, con lo cual se rechaza la H_0 , de la población no corresponde a una distribución normal. Podemos ver que el p valor es 0,0913, con lo que decimos que los datos siguen una distribución normal.

Tabla 10.

Test de Bondad de Ajuste de Shapiro Wilk para viabilidad de espermios del eyaculado de CPP

Variable	n	Media	DE	W	P (Unilateral D)
MORF (%)	16	75,25	4,57	0.97	0,8711

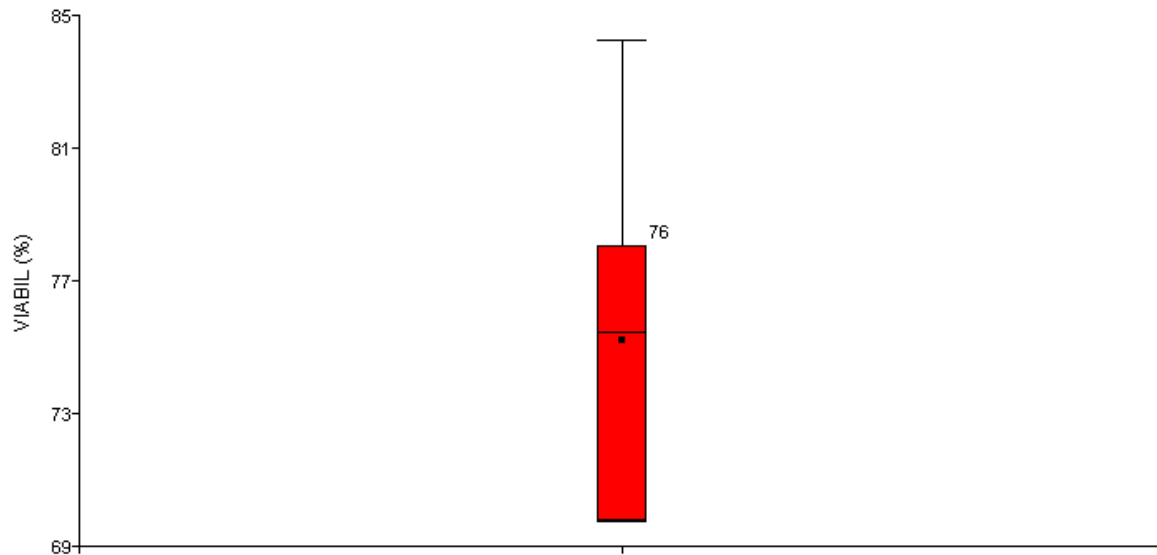
Tabla 11.

Medidas de resumen para la viabilidad espermática del semen fresco.

Resumen	MOT (%)
N	16,00
Media	75,25
D.E.	4,57
Var (n -1)	20,87
E.E.	1,14
CV	6,07
Min	70,00
Max	84,00
Mediana	75,50
Q1	70,00
Q3	78,00
Asimetría	0.32
Kurtosis	-1,11

En la **tabla 11**, podemos ver las medidas de tendencia central y de dispersión de la viabilidad espermática, con una media de 75,25% +/- 4,57%, con un valor máximo de 84% y un valor mínimo de 70%.

Al encontrarse una distribución normal nos señala que la evaluación de la viabilidad estuvo adecuada y que la distribución de los datos se distribuye de forma simétrica.

Figura 8.**Blox-Plot de las medidas de resumen de la viabilidad de espermios del eyaculado de CPP**

En la figura 8, podemos ver en el diagrama de caja y bigotes, la muy baja dispersión en la distribución de los datos, al tener la media y mediana tienen valores muy cercanos, y muy ligera asimetría a la derecha así mismo el Q1 es 70% y el Q3 78%, sin presencia de datos atípicos y platicurtica.

La viabilidad espermática del semen equino refleja la integridad de la membrana plasmática y de las membranas acrosómicas de los espermatozoides, característica previamente vinculada a la probable fertilidad (63).

La determinación de la integridad de la membrana plasmática es un componente crucial del espermiograma, dada la importancia de esta estructura para mantener la viabilidad del espermatozoide. La evaluación es crucial para evaluar la fertilidad del macho, ya que la preservación de la información genética depende esencialmente del estado óptimo de la membrana plasmática (65; 70).

Además, es fundamental no solo para el metabolismo del gameto sino también para otros procesos de fertilización, incluida la capacitación, la respuesta acrosomal y la fusión con el óvulo (67).

Tabla 12.

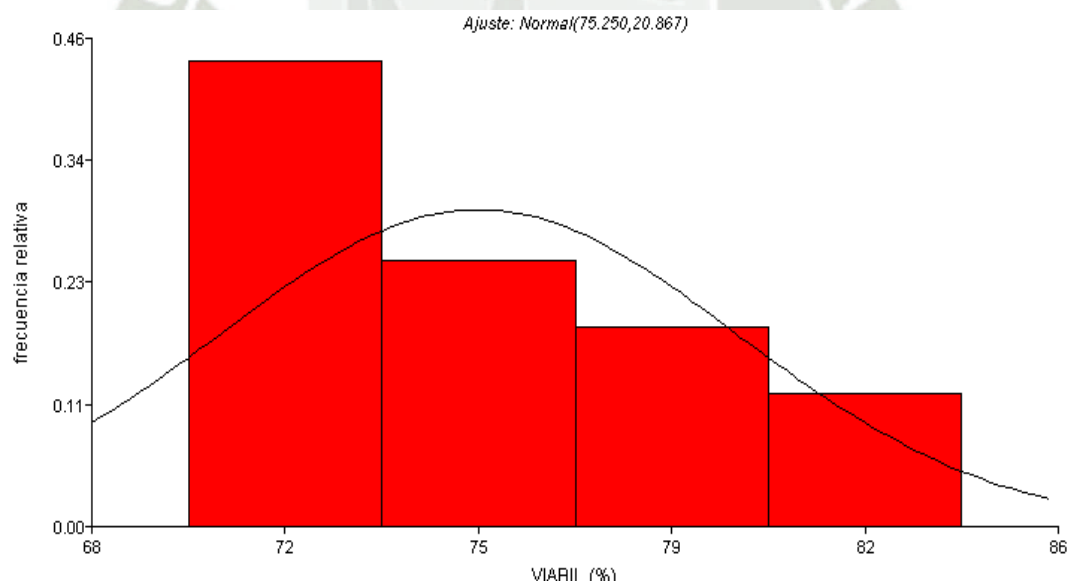
Distribución de frecuencias para la viabilidad del espermio del eyaculado de CPP

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
VIABIL (%)	1	(70,00 – 73,50)		71,75	7	0,44	4	0,44
VIABIL (%)	2	(73,50 – 77,00)		75,35	4	0,25	11	0,69
VIABIL (%)	3	(77,00 – 80,50)		78,75	3	0,19	14	0,88
VIABIL (%)	4	(80,50 – 84,00)		82,25	2	0,13	16	1,00

En la **tabla 12**, podemos ver la distribución de frecuencias en 4 clases según la regla de Sturges, siendo la clase 1, con un promedio de 71,75 % de viabilidad espermática, la que presenta mayor número de muestras evaluadas.

Figura 9.

Histograma de la viabilidad del espermio del eyaculado de CPP



El histograma de la **figura 9**, presenta un solo pico correspondiente al 72% de la viabilidad espermática, con una dispersión entre 72 y 82%, y presenta un ajuste normal.

Las pruebas funcionales que examinan la estructura íntegra de la membrana espermática como la prueba de endosmosis (prueba del huésped), permiten evaluar la funcionalidad de esta membrana midiendo la resistencia osmótica de los espermatozoides en medios hipoosmóticos (68).

El espermatozoide puede absorber o expulsar agua en función de la osmolaridad del entorno extracelular, lo que indica la funcionalidad óptima de su membrana plasmática y su capacidad de distribución de fluidos interna y externamente. Este parámetro se ha asociado con la fertilidad masculina (69, 70).

La evaluación de la estructura integra acrosomal, junto con la evaluación de la estructura integra de la membrana espermática, se ha investigado ampliamente como parámetro seminal debido a su papel crítico en la fertilización. Solo los espermios con un acrosoma intacto pueden ejecutar la reacción acrosómica en sincronía con la fase de penetración de los ovocitos, facilitando en última instancia la fusión para formar un embrión (67).

4.4 Concentración espermática del semen fresco

Al analizar las muestras del eyaculado (n = 16), se obtuvieron los siguientes resultados expresados en la tabla 13.

Tabla 13.

Concentración de espermios del eyaculado (millones/ml) en CPP

	Padrillo No. 1	Padrillo No. 2	Padrillo No. 3	Padrillo No. 4
Eyaculado Nº 1	168,00	224,00	209,00	222,00
Eyaculado Nº 1	172,00	283,00	202,00	246,00
Eyaculado Nº 1	173,00	245,00	237,00	256,00
Eyaculado Nº 1	221,00	287,00	230,00	258,00

La concentración espermática determinada microscópicamente fue de entre 168 y 287 millones/ml. La concentración y el volumen exhiben una diversidad significativa y se ven fuertemente afectados por numerosos factores, incluido el tamaño testicular, el método de recolección (completo o fraccional), la edad de los sementales y la raza (161).

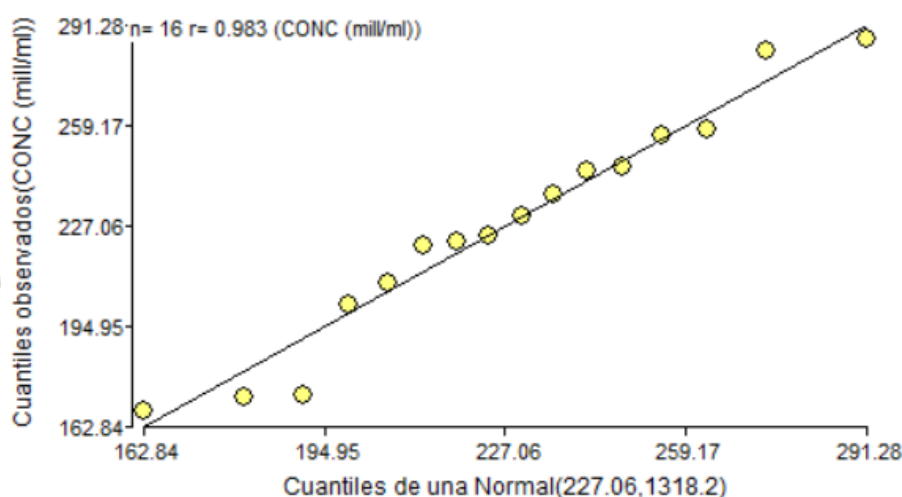
El valor promedio generalmente varía de 50 a 150 x10⁶ espermatozoides/ml cuando se recolecta la eyaculación completa utilizando métodos aceptables (160). Se utilizó un espectrofotómetro automático para evaluar indirectamente la absorbancia o dispersión de la luz generada por los espermatozoides en una muestra, correlacionándolo con la concentración de espermatozoides. Para que este procedimiento arroje resultados correctos, se requiere una calibración previa mediante

una curva establecida mediante recuento con microscopio a través de una cámara, ya que la transmitancia fluctúa con la concentración de esperma. Además, depende del tamaño y morfología de los espermatozoides, el índice de refracción, estos últimos varían entre individuos (161).

Este enfoque es efectivo en muestras de esperma limpias; sin embargo, tiene límites cuando la solución está contaminada con compuestos que no son espermatozoides, lo cual es típico en el esperma de semental, lo que puede provocar una sobreestimación de la concentración de esperma (102).

Figura 10.

QQ-Plot de la concentración de espermios del eyaculado (millones/ml) de CPP



En el QQ-Plot, de la **figura 10**, podemos observar que el $r=0,983$, lo que nos señalan que los datos de concentración espermática de los 16 eyaculados, siguen una distribución normal.

Tabla 14.

Test de Bondad de Ajuste de Shapiro Wilk para la concentración de espermios del eyaculado de CPP

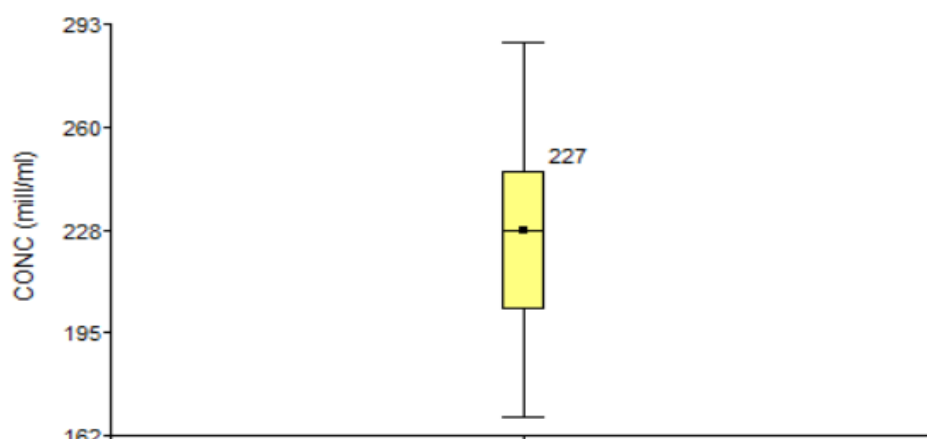
Variable	n	Media	DE	W	P (Unilateral D)
CONC (mill/ml)	16	227,06	36,31	0.93	0,4009

Tabla 15.
Medidas de resumen para la concentración de espermios del eyaculado de CPP.

Resumen	MOT (%)
N	16.00
Media	227,06
D.E.	36,31
Var (n -1)	1318,20
E.E.	9,08
CV	15,99
Min	168,00
Max	287,00
Mediana	227,00
Q1	202,00
Q3	246,00
Asimetría	-0.15
Kurtosis	-0,75

En la **tabla 15**, se encuentran las medidas de tendencia central y de dispersión de la concentración espermática, con una media de 227,06 +/- 36,31 millones /ml con un valor máximo de 287,00 millones /ml y un valor mínimo de 168.00 millones/ml de espermatozoides.

Figura 11.
Box-Plot comparando las medidas de resumen de la concentración de espermios de l eyaculado de CPP



En la figura **11**, podemos ver en el diagrama de caja y bigotes, la casi inexistente dispersión en la distribución de los datos ya que la media y mediana tienen valores

casi iguales, y muy ligera asimetría a la izquierda, así mismo el Q1 es 202,00 millones /ml y el Q3 es 246,00 millones /ml, sin presencia de datos atípicos y platicurtica.

Tabla 16.

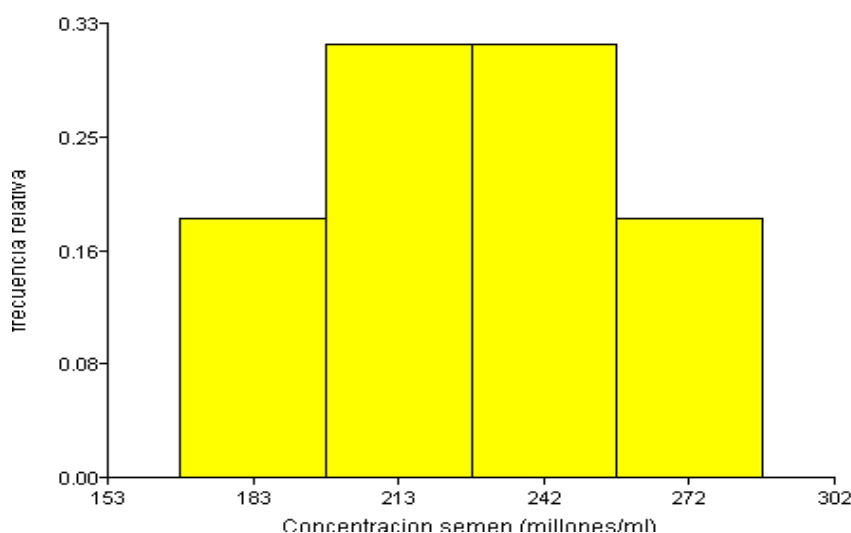
Distribución de frecuencias para la concentración de espermios del eyaculado de CPP

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
CONC (mill/ml)	1	(168,00 – 197,75)	182,88	3	0,19	3	0,19	
CONC (mill/ml)	2	(197,75 – 227,50)	212,63	5	0,31	8	0,50	
CONC (mill/ml)	3	(227,50 – 257,25)	242,38	5	0,31	13	0,81	
CONC (mill/ml)	4	(257,25 – 287,00)	272,13	3	0,19	16	1,00	

En la **tabla 16**, podemos ver la distribución de frecuencias en 4 clases según la regla de Sturges, siendo las clases 2 y 3, las con mayor número de datos con 5 cada una y una marca de clase para la 2 de 212,63 millones/ml y para la 3 de 242,38 millones/ml de concentración espermática.

Figura 12.

Histograma de la concentración de espermios del eyaculado de CPP



Como se puede observar en la **figura 12**, la concentración espermática presenta una distribución normal casi perfecta ajustándose.

La IA con semen congelado en equinos, se usa mucho menos que la realizada con semen fresco y semen refrigerado (162; 163). Esto se debe, al menos en parte, a las diferencias en la capacidad de fertilización del semen congelado-descongelado entre los sementales (164; 165; 166; 167).

4.5 Motilidad espermática de semen de las pajillas usando como crioprotector DMF.

En la **tabla 17**, se muestra los valores de motilidad espermática obtenidos de las muestras de semen de las pajillas descongeladas ($n = 64$), a diferentes concentraciones de DMF (4) de 1 a 4%.

Tabla 17.
Motilidad de las muestras de semen de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	45	48	46	40	40	44	45	39	45	46	39	37	43	45	39	40
E2	46	47	41	36	42	46	45	36	44	48	40	35	42	46	38	37
E3	48	43	44	41	42	43	45	40	47	42	38	39	43	47	39	36
E4	46	41	45	42	43	43	43	38	41	44	40	38	44	40	36	35

Nuestras medias de motilidad pos-descongelación de las pajillas empleando DMF fueron 43,81 +/- 2,23 % para DMF 1%; 44,56 +/- 2,45 para DMF 2%; 41,69 +/- 3,18 para DMF al 3% y 38,06 +/- 2,17 para DMF al 4%. De estos resultados de las medias entre grupos podemos ver que la mayor motilidad pos-descongelación corresponde a en empleo del crioprotector glicerol a la concentración de 2%. El valor máximo de motilidad fue 48% y el mínimo 41%. Los CV no superaron el 30%, indicando no existencia de dispersión de los datos, siendo los de la concentración de DMF 1% con el menor CV de 5,08% y DMF al 3% los de mayor CV con 7,62%.

La calidad del semen de los sementales después de la congelación y descongelación difiere entre los sementales, pero queda por determinar si tales diferencias también se ven afectadas por la raza del caballo. Existen diferencias en la criotolerancia (168).

En la **tabla 17**, podemos comparar los valores de las medias de motilidad para las 4 concentraciones de DMF, de los cuales, el mayor valor corresponde a la DMF 2%, con

una media de 44,56 +/- 2,45 y un CV de 5,49%, mientras que el menor valor corresponde a la DMF 4%, con una media de 38,06 +/- 2,27 y un CV de 5,71%. En las 4 concentraciones de DMF, podemos observar la poca variabilidad con la media, y podemos decir que las estimaciones son muy precisas en las 4 concentraciones ya que en ninguna el CV supero el 7%, considerándose valores precisos.

La DMF así como la DMA parece ser un buen agente crioprotector para la crio preservación del semen de sementales caballos peruanos de paso (169).

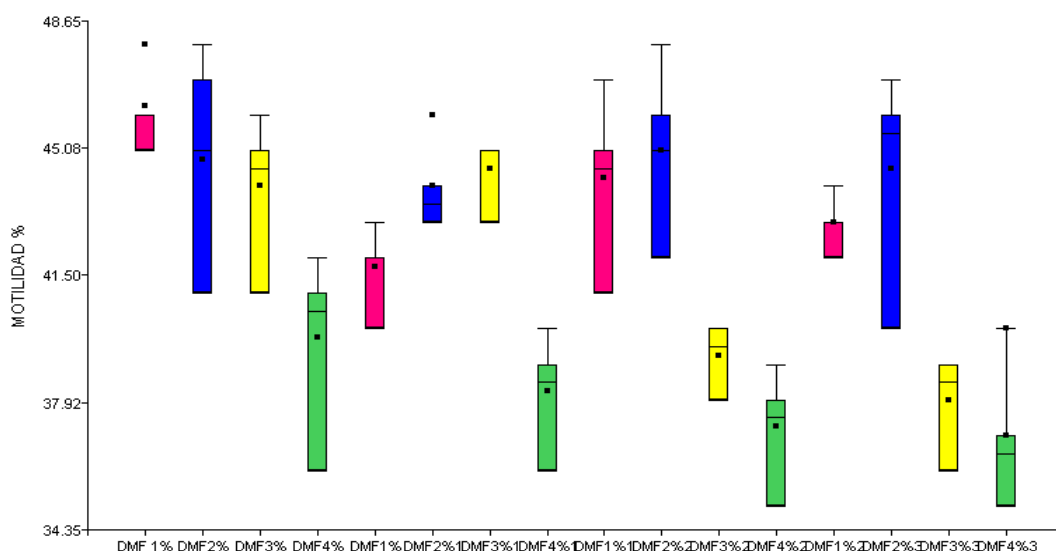
Tabla 18.

Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la motilidad de espermios poscongelamiento.

	DMF 1%	DMF 2%	DMF 3%	DMF 4%
Media	43.81	44,56	41,69	38,06
D.E.	2,23	2,45	3,18	2,17
CV	5,08	5,49	7,62	5,71

Figura 13.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de movilidad de espermios post descongelamiento



En la **figura 13**, comparamos los Blox plot viendo una notable diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de 1% y 2% frente a los de 3% y 4%, siendo los primeros solapados.

La motilidad espermática con la DMF se mantuvo ligeramente más alta durante la evaluación en relación con el GLY, pero para ambos tratamientos la motilidad decayó en el mismo intervalo de tiempo pos-descongelación.

4.6 Morfología normal de los espermios de las pajillas usando como crioprotector DMF.

En la **tabla 19**, muestra los valores de morfología normal obtenidos de las muestras de semen de las pajillas descongeladas (n=64) a diferentes concentraciones de DMF.

Tabla 19.
Morfología normal de los espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF.

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	69	70	68	66	71	73	69	68	73	74	73	72	71	70	71	70
E2	70	71	72	70	66	70	65	60	73	73	71	69	71	71	72	71
E3	65	75	64	65	69	71	70	67	77	79	76	77	74	72	75	70
E4	71	73	72	70	68	72	64	66	78	76	78	75	71	70	74	71

En la **tabla 19**, podemos comparar los valores de las medias de morfología para las 4 concentraciones de DMF, de los cuales, el mayor valor corresponde a la DMF 2%, con una media de 72.50 +/- 2.53 y un CV de 3.49 %, mientras que el menor valor corresponde a la DMF 4%, con una media de 69.19 +/- 2,27 y un CV de 4.00 %. En las 4 concentraciones de DMF podemos observar la poca variabilidad con la media en la DMF al 1% y 2%, mientras que de aumenta a más de 4% en la DMF al 3 % y 4 %, así mismo, las estimaciones son muy precisas en las 4 concentraciones ya que en ninguna el CV supero el 7%, considerándose valores precisos.

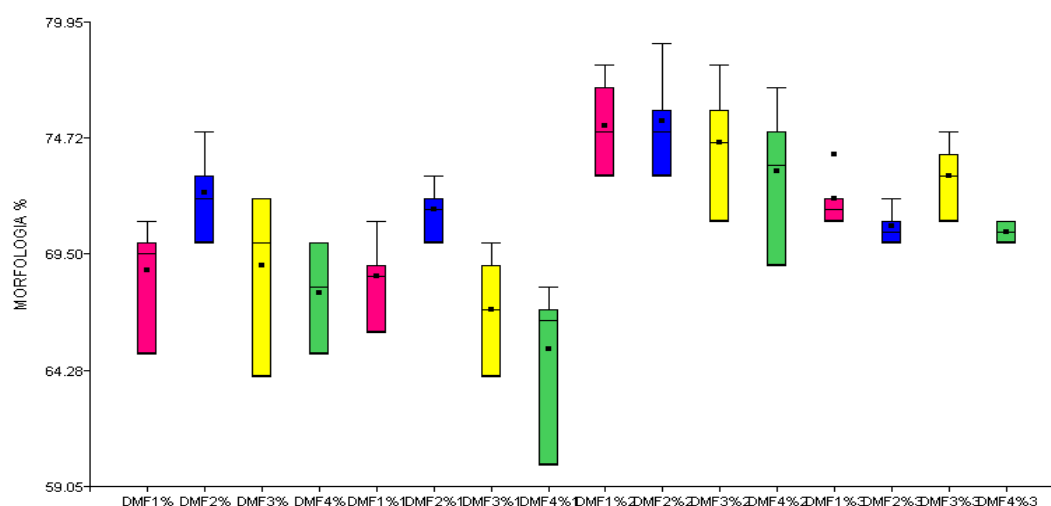
Tabla 20.

Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la morfología de espermios poscongelamiento.

	DMF 1%	DMF 2%	DMF 3%	DMF 4%
Media	71,56	72,50	70,88	69.19
D.E.	3,42	2,53	4,11	4,00
CV	4,79	3,49	5,80	5,79

Figura 14.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología de espermios post descongelamiento



En la **figura 14**, comparamos los Blox plot viendo una notable diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de 1% y 2% frente a los de 3% y 4%, siendo los primeros solapados.

4.7 Viabilidad espermática de espermios de las pajillas usando como crioprotector DMF.

La **tabla 21**, muestra la viabilidad espermática obtenida de las muestras de semen de las pajillas descongeladas (n = 64).

Tabla 21.

Viabilidad de las muestras de semen de las pajillas descongeladas usando como crioprotector DMF

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	42	46	45	39	39	43	43	39	44	46	39	36	43	45	39	39
E2	45	47	40	36	42	46	45	36	43	47	38	34	43	45	36	37
E3	47	43	43	40	41	43	44	39	46	43	38	38	42	46	38	35
E4	45	41	44	42	42	42	42	38	41	45	41	36	44	40	35	33

En la **tabla 21**, podemos comparar los valores de las medias de viabilidad para las 4 concentraciones de DMF, de los cuales, el mayor valor corresponde a DMF 2%, con una media de 44,25 +/- 2,14 y un CV de 4.85 %, mientras que el menor valor corresponde a DMF 4%, con una media de 37,31 +/- 2,36 y un CV de 6.32 %. En las 4 concentraciones de DMF podemos observar la poca variabilidad con la media en la DMF al 1%, 2%, mientras que de aumenta a más de 7.88 % en la DMF al 3 %, así mismo, las estimaciones son muy precisas en la DMF al 1%, 2% y 4% que manifiestan valores precisos, lo que no ocurre en la concentración del 3%, la cual supero el 7%, considerándose valores imprecisos.

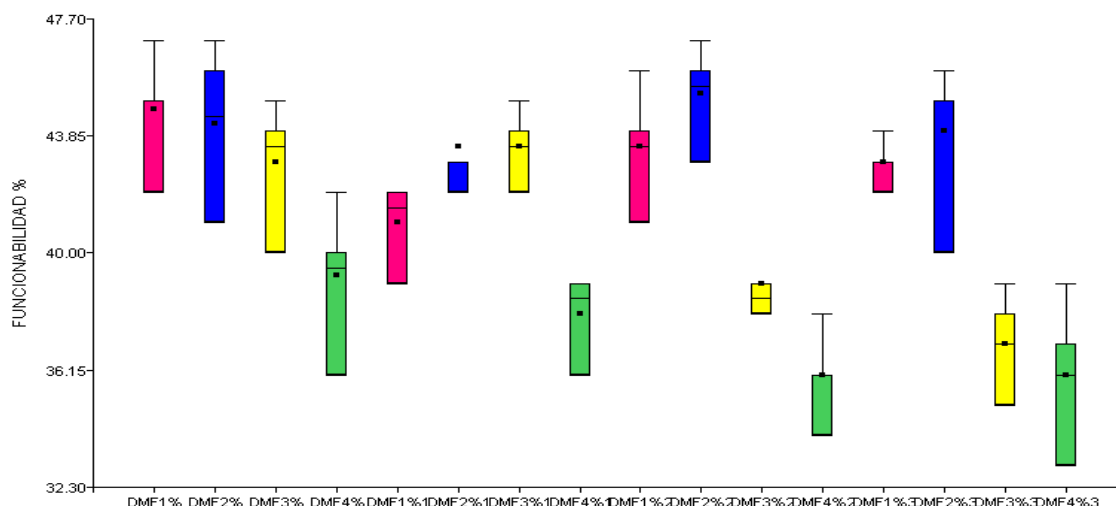
Tabla 22.

Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de DMF sobre la viabilidad de espermios poscongelamiento.

	DMF 1%	DMF 2%	DMF 3%	DMF 4%
Media	43,06	44,25	40,63	37,31
D.E.	2,05	2,14	3,20	2,36
CV	4,76	4,85	7,88	6,32

Figura 15.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de viabilidad de espermios post descongelamiento



En la **figura 15**, comparamos los Blox plot viendo notable $\mu\mu$ diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de 1%, 2% y 4% frente a la de 3%, siendo los primeros solapados. Se presentó un aumento de espermios anormales después del proceso de congelación, como se ha reportado en otras investigaciones (170).

4.8 Motilidad espermática de semen de las pajillas usando como crioprotector GLY.

En la **tabla 23**, se muestra la motilidad obtenida de las muestras de semen de las pajillas descongeladas (%) (n = 64).

Tabla 23.

Motilidad de los espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	43	44	40	38	38	40	41	35	41	42	37	34	40	41	36	37
E2	44	43	39	34	40	41	42	34	41	44	36	31	39	41	34	33
E3	45	40	41	39	39	39	41	38	42	39	35	36	39	40	33	31
E4	44	38	42	38	40	40	42	33	38	43	37	36	38	34	32	32

En la **tabla 24**, podemos comparar los valores de las medias de motilidad para las 4 concentraciones de GLY, de los cuales, el mayor valor corresponde a la GLY 1%, con una media de 40,69 +/- 2,30 y un CV de 5,66%, mientras que el menor valor corresponde a la DMF 4%, con una media de 34,94 +/- 2,59 y un CV de 7,42 %. En las 2 primeras concentraciones de GLY podemos observar la poca variabilidad de la media en la GLY al 1%, 2%, mientras que de aumenta a más de 7 % en la GLY al 3 % y 4% que manifiestan valores no precisos.

Tabla 24.

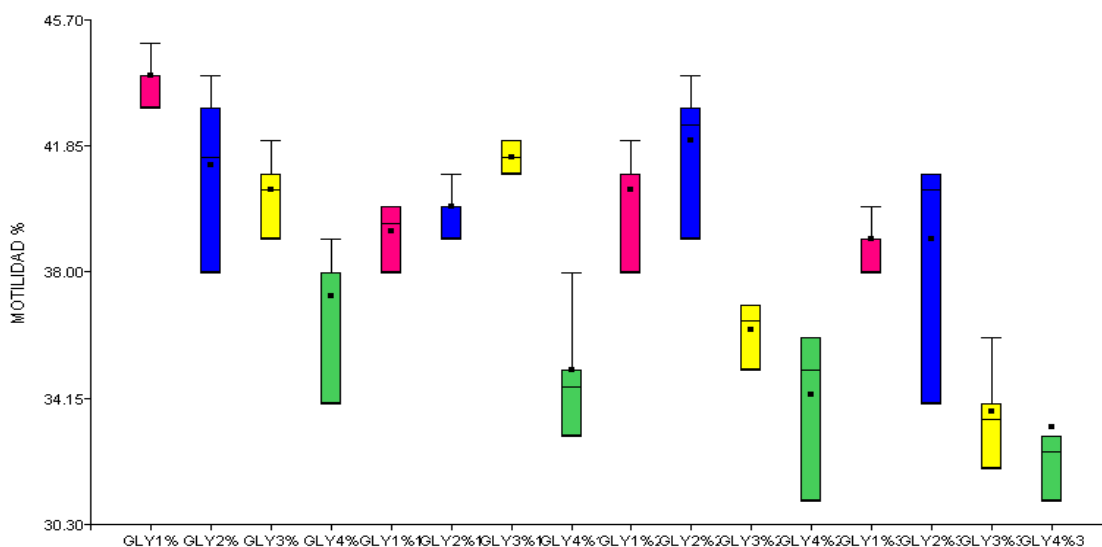
Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la motilidad de espermios poscongelamiento.

	GLY 1%	GLY 2%	GLY 3%	GLY 4%
Media	40,69	40,56	38,00	34,94
D.E.	2,30	2,50	3,43	2,59
CV	5,66	6,17	9,01	7,42

Se ha reportado que el uso del GLY como criopreservante del semen puede ser un factor involucrado en movilidad reducida y vigor espermático (127).

Figura 16.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de motilidad de espermios post descongelamiento



En la **figura 16**, comparamos los Blox plot viendo una notable diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de 1%, 2% frente a las de 3% y 4%, siendo los primeros solapados.

4.9 Morfología normal espermática de semen de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY.

En la **tabla 25**, muestra la morfología normal obtenida de las muestras de semen de las pajillas descongeladas (n = 64).

Tabla 25.

Morfología normal de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	68	69	66	65	70	71	67	65	71	71	70	70	69	70	70	68
E2	69	70	71	66	64	70	64	58	71	72	70	72	71	70	71	69
E3	63	71	62	61	66	71	69	65	73	77	74	74	72	71	72	70
E4	70	71	70	68	67	72	63	64	76	75	76	73	70	68	71	69

En la **tabla 26**, podemos comparar los valores de las medias de morfología normal espermática para las 4 concentraciones de GLY, de los cuales, el mayor valor corresponde a la GLY 2%, con una media de 71,19 +/- 2,17 y un CV de 3,04 %, mientras que el menor valor corresponde al GLY 4%, con una media de 67,314 +/- 4.29 y un CV de 6,37 %. En las concentraciones de GLY 1% y 3%, podemos observar la poca variabilidad, mientras que aumenta a más en GLY al 3 % y 4%, sin embargo ningún CV supera el 7% manifiestan valores precisos.

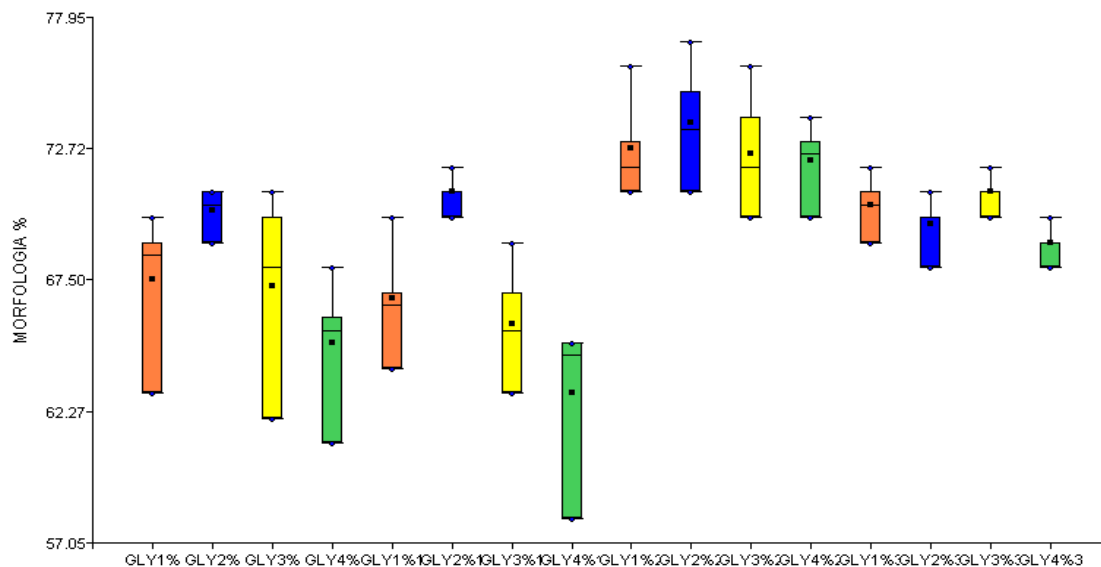
Tabla 26.

Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la morfología normal de espermios en semen poscongelamiento.

	GLY 1%	GLY 2%	GLY 3%	GLY 4%
Media	69,38	71,19	69,13	67,31
D.E.	3,28	2,17	3,84	4,29
CV	4,73	3,04	5,56	6,37

Figura 17.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de morfología normal de espermios post descongelamiento



En la **figura 17**, comparamos los Blox plot viendo una notable diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de GLY 1%, 2% y 3% frente a las de GLY 4%, siendo los primeros solapados.

4.10 Viabilidad de espermios de las pajillas usando como crioprotector GLY.

En la **tabla 27**, muestra la viabilidad espermática obtenida de las muestras de semen de las pajillas descongeladas (n = 64).

Tabla 27.

Viabilidad de espermios de las pajillas descongeladas usando como crioprotector GLY

	Padrillo No. 1				Padrillo No. 2				Padrillo No. 3				Padrillo No. 4			
	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%	1%	2%	3%	4%
E1	40	45	37	37	37	41	42	37	43	45	37	33	43	46	38	36
E2	44	43	39	34	40	43	44	33	42	44	39	35	41	43	36	33
E3	45	41	41	39	40	43	41	36	44	43	38	36	40	45	37	35
E4	40	39	43	40	41	40	40	37	40	41	38	33	42	41	34	30

En la **tabla 28**, podemos comparar los valores de las medias de viabilidad espermática para las 4 concentraciones de GLY, de los cuales, el mayor valor corresponde a la GLY 2%, con una media de 42,69% +/- 2,02 y un CV de 4,74 %, mientras que el menor valor corresponde al GLY 4%, con una media de 35,25 +/- 2,54 y un CV de 7,21 %. En las concentraciones de GLY 1%, 2% y 3%, podemos observar la poca variabilidad, mientras que aumenta a más en GLY 4%, manifiestan este último valor no precisos.

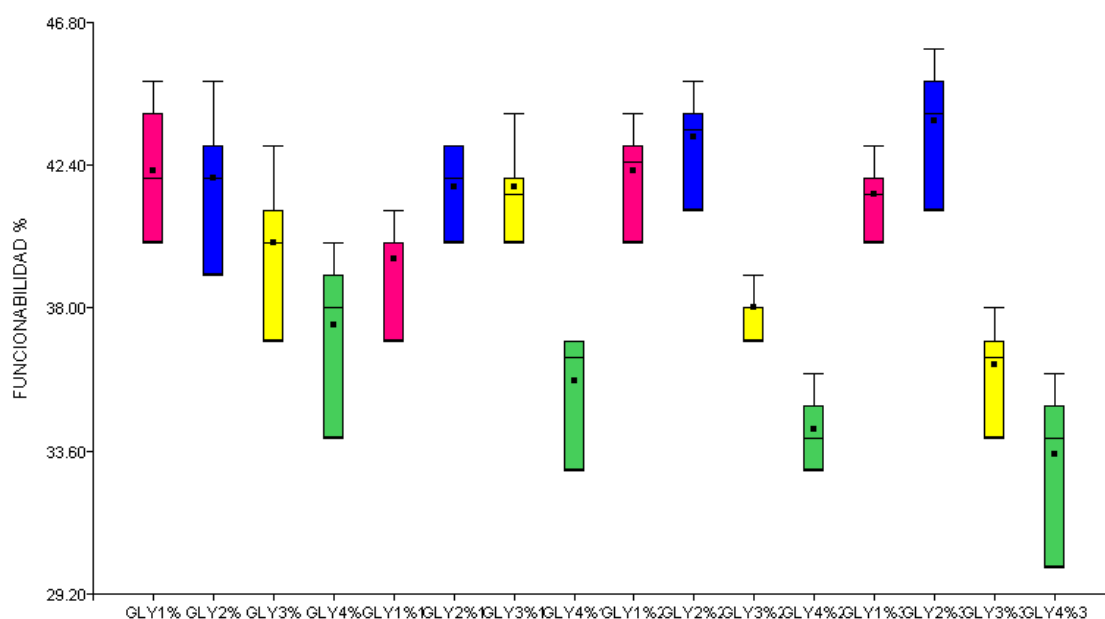
Tabla 28.

Medidas de resumen de las diferentes concentraciones de GLY sobre la viabilidad espermática en semen poscongelamiento.

	GLY 1%	GLY 2%	GLY 3%	GLY 4%
Media	41,36	42,69	39,00	35,25
D.E.	2,06	2,02	2,68	2,54
CV	4,98	4,74	6,88	7,21

Figura 18.

Blox plot de las medidas de resumen de los valores de viabilidad normal espermática se semen post descongelamiento



En la **figura 18**, comparamos los Blox plot viendo una notable diferencia entre los datos correspondientes a las concentraciones de GLY 1%, 2% y 3% frente a las de GLY 4%, siendo los primeros solapados.

El GLY ha servido como crioprotector para el semen. Atraviesa la membrana plasmática por difusión pasiva, persiste en la membrana y a nivel intracitoplasmático e induce efectos osmóticos perjudiciales en los espermatozoides. Además, se asocia con los fosfolípidos de la membrana, disminuyendo su fluidez (171.) La metilformamida posee un peso molecular y una viscosidad disminuidos en comparación con el GLY, lo que resulta en una mayor permeabilidad al esperma de semental y menos daño (54).

Los crioprotectores que incluyen DMF y GLY se han vuelto cada vez más favorecidos, ya que tienden a mantener la motilidad de los espermios de manera más efectiva que los extensores comerciales que contienen únicamente GLY y son superiores en el mantenimiento de las mitocondrias.

A pesar de los avances en la CP del semen de semental, la eficacia de fertilización del semen congelado y descongelado sigue siendo inferior a la del semen fresco o refrigerado; por lo tanto, se deben emplear los métodos y técnicas de CP más efectivos (187; 188; 12; 189; 185).

En el semen congelado, se hacen esfuerzos para preservar la viabilidad del esperma mediante la utilización de diluyentes y crioprotectores que nutren el esperma e inhiben el deterioro durante todo el proceso de congelación (169).

Es crucial reconocer la gran variedad en la calidad seminal entre los individuos e incluso dentro de los eyaculados del mismo individuo (160), así como en su resistencia a los procesos de CP respecto a la viabilidad del esperma después de la descongelación (191).

Los procesos de congelación y descongelación afectan negativamente a los espermatozoides, lo que resulta en una tasa de concepción reducida. En equinos, se ha demostrado que causan fragmentación del ADN espermático (184), YDm reducida (192), daño al acrosoma (193) y la producción de ROS espermáticos (anión superóxido intracelular) (194).

El GLY es un crioprotector que parece ejercer efectos tóxicos sobre el semen equino (53), induce la desnaturalización de proteínas, altera las interacciones de actina (195) y provoca estrés osmótico debido a su tasa de penetración más lenta en comparación con otros crioprotectores. A nivel intracitoplasmático, da como resultado un aumento de la viscosidad, modificaciones en la polimerización de tubulina y cambios en la asociación de microtúbulos (196). Otros compuestos de menor peso molecular, tales como DMF, han demostrado una eficacia superior en el proceso de crioconservación. (197). El uso de DMSO y amidas mejora la viabilidad y motilidad posteriores a la descongelación en comparación con GLY (54).

4.11 Comparación entre los crioprotectores DMF y GLY a 4 concentraciones diferentes: 1%, 2%, 3% y 4%

Para la comparación de medias se usó una prueba de Tukey con su correspondiente ANOVA.

Al realizar el ANOVA de la data obtenida de la evaluación microscópica de semen de equinos, empleando como agente protector DMF y GLY a 1%, 2%, 3 y 4%, obtuvimos como coeficientes de determinación 0.96; 0.97; 0.94 y 0.96 mientras que para GLY obtuvimos como coeficientes de determinación 0.97; 0.98: 0.96 y 0.96, existiendo alta significancia para las 4 concentraciones de los dos dilutores DMF y GLY. Es decir, hay efecto significativo entre las concentraciones de los dos dilutores. Así mismo el CV de los 2 dilutores y las 4 concentraciones es bajo inferior al 10%

Tabla 29.

Medidas de resumen de los 2 crioprotectores (DMF y GLY) a las 4 concentraciones para Motilidad, morfología y viabilidad espermios descongela

En la **tabla 29** se compran los resultados de las evaluaciones de las muestras de semen sometidas a las 4 concentraciones de los 2 dilutores presentando sus medidas de resumen.

Motilidad	Media	D.E.
DMF1%	43,81	2,23
GLY 1%	40,69	2,30
DMF2%	44,56	2,45
GLY 2%	42,24	7,31
DMF3%	41,69	3,18
GLY 3%	38,00	3,43
DMF4%	38,06	2,17
GLY 4%	34,94	2,59
Morfología		
DMF1%	71,56	3,42
GLY 1%	69,38	3,28
DMF2%	72,50	2,53
GLY 2%	71,19	2,17
DMF3%	70,88	4,11
GLY 3%	69,13	3,84
DMF4%	69,19	4,00
GLY 4%	67,31	4,29
Viabilidad		
DMF1%	43,06	2,05
GLY 1%	41,38	2,06
DMF2%	44,25	2,14
GLY 2%	42,69	2,02
DMF3%	40,63	3,20
GLY 3%	39,00	2,68
DMF4%	37,31	2,36
GLY 4%	35,25	2,54

Como se puede observar en la **tabla 29**, al comprar las medias obtenemos numéricamente valores superiores en todas las concentraciones de DMF frente a GLY, con lo que los datos de la presente investigación, coinciden con datos reportados por la literatura de las ventajas de la DMF y las midas solas o combinadas en la crio preservación de semen de caballos, pudiendo deberse según estudios a que el GLY produce más daño osmótico (DMF 73 g/mol / GLY 92 g/mol; 25% más)(198);

disminuye la fluidez de la membrana plasmática en un 40% (198), no preservando los microdominios (199); produce una reacción acrosomal mayor que la DMF (GLY 35.2% / DMF 22,7%) (200); genera mayor cantidad de Malondialdehído que la DMF (GLY MDA 4,2 nmol x 10⁸ / MDA 2,8 nmol x 10⁸) así como también produce una mayor depleción de la Glutación Peroxidasa (GLY 45% / DMF 28%) (201), por otra parte la DFM preserva mejor la función mitocondrial (DMF 58,7 / GLY 42,3%) (202); da una mejor integridad del ADN produciendo menos desfragmentación (DMF 12,3% / GLY 18,5%) (203); muchas de estas ventajas podrían deberse a que la DFM cuenta con cinética de penetración: mayor (Lp)(DMF 0,41 +/- 0,05 µm/min/at / GLY 0,27 +/- 0,03 µm/min/atm) y también por el tiempo equilibrio osmótico que es mucho más rápido (DMF 3-5 minutos frente a los 8 a 10 minutos del GLY), (204).

Figura 19. Análisis de la varianza de la comparación

Análisis de la varianza

DMF1%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF1%	48	0.96	0.96	5.05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8442.70	3	2814.23	396.11	<0.0001
Evaluacion espermatica	8442.70	3	2814.23	396.11	<0.0001
Error	312.61	44	7.10		
Total	8755.31	47			

DMF2%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF2%	48	0.97	0.97	4.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8425.88	3	2808.63	497.10	<0.0001
Evaluacion espermatica	8425.88	3	2808.63	497.10	<0.0001
Error	248.60	44	5.65		
Total	8674.48	47			

DMF3%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF3%	48	0.94	0.94	6.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		9437.58	3	3145.86	251.11	<0.0001
Evaluacion espermatica		9437.58	3	3145.86	251.11	<0.0001
Error		551.23	44	12.53		
Total		9988.81	47			

DMF4%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF4%	48	0.96	0.96	6.18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		10593.04	3	3531.01	398.09	<0.0001
Evaluacion espermatica		10593.04	3	3531.01	398.09	<0.0001
Error		390.28	44	8.87		
Total		10983.31	47			

Análisis de la varianza

GLY1%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY1%	48	0.97	0.96	5.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		8576.08	3	2858.69	416.64	<0.0001
Evaluacion Espermtica		8576.08	3	2858.69	416.64	<0.0001
Error		301.90	44	6.86		
Total		8877.98	47			

GLY2%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY2%	48	0.98	0.97	4.40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		9358.50	3	3119.50	608.75	<0.0001
Evaluacion Espermtica		9358.50	3	3119.50	608.75	<0.0001
Error		225.47	44	5.12		
Total		9583.98	47			

GLY3%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY3%	48	0.95	0.95	6.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		10038.83	3	3346.28	307.33	<0.0001
Evaluacion Espermtica		10038.83	3	3346.28	307.33	<0.0001
Error		479.08	44	10.89		
Total		10517.92	47			

GLY4%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY4%	48	0.96	0.96	7.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		11089.83	3	3696.61	356.04	<0.0001
Evaluacion Espermtica		11089.83	3	3696.61	356.04	<0.0001
Error		456.84	44	10.38		
Total		11546.67	47			

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.38	0.36	7.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo		763.03	4	190.76	19.21	<0.0001	
Concentracion %		374.52	3	124.84	12.57	<0.0001	
Crioprotector		388.51	1	388.51	39.13	<0.0001	-3.48
Error		1221.27	123	9.93			
Total		1984.30	127				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.02719

Error: 9.9291 gl: 123

Concentracion %	Medias	n	E.E.
1	41.84	32	0.56 A
2	41.69	32	0.56 A
3	40.03	32	0.56 A
4	37.59	32	0.56 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Existe diferencia significativa entre tan solo entre la concentración 4% tanto de GLY y DMF

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Morf sem des %	128	0.08	0.05	5.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	152.38	4	38.09	2.82	0.0278	
Concnracion %	50.84	3	16.95	1.26	0.2924	
Crioprotector	101.53	1	101.53	7.53	0.0070	-1.78
Error	1659.09	123	13.49			
Total	1811.47	127				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.36278

Error: 13.4886 gl: 123

Concnracion %	Medias	n	E.E.
2	70.72	32	0.65 A
3	70.53	32	0.65 A
1	70.22	32	0.65 A
4	69.09	32	0.65 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

No existe diferencia significativa entre tan solo entre las diversas concentraciones tanto de GLY y DMF

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viab sem des %	128	0.28	0.26	7.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	500.16	4	125.04	12.23	<0.0001	
Concnracion %	403.90	3	134.63	13.17	<0.0001	
Crioprotector	96.26	1	96.26	9.42	0.0026	-1.73
Error	1257.46	123	10.22			
Total	1757.62	127				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.05700

Error: 10.2233 gl: 123

Concnracion %	Medias	n	E.E.
2	42.16	32	0.57 A
1	41.75	32	0.57 A
3	40.25	32	0.57 A
4	37.63	32	0.57 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Existe diferencia significativa entre tan solo entre la concentración 4% tanto de GLY y DMF

CAPÍTULO V.

5. CONCLUSIONES

PRIMERA: El efecto tipo de crioprotector en la motilidad es altamente significativo al igual que la concentración de estos, sin embargo al comparar las medias solo la concentración al 4% tanto de DMF y GLY son significativamente diferentes ($p < 0,05$); en el caso de morfología normal, tanto el crioprotector como la concentración no son significativas, al comparar sus medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$); finalmente parbhy.a la viabilidad espermática el efecto crioprotector y concentración son altamente significativos y al comprar sus medias solo la concentración al 4% tanto de DMF y GLY son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

SEGUNDA: La movilidad de los espermios de las pajillas descongeladas de CPP fue de 44.56 % +/- 2.45%, para la concentración de DMF al 2% frente a 40.69 % +/- 2.30% para la concentración de GLY al 1% siendo altamente significativo.

TERCERA: La morfología normal de los espermios descongelados de CPP fue de 72.50 % +/- 2.53%, para la concentración de DMF al 2% frente a 71.19 % +/- 2.17% para la concentración de GLY al 2% siendo altamente significativo.

CUARTA: La viabilidad de los espermios descongelados de CPP fue de 44.25 % +/- 2.14%, para la concentración de DMF al 2% frente a 42.69 % +/- 2.02% para la concentración de GLY al 2% siendo altamente significativo.

CAPÍTULO VI.

6. RECOMENDACIONES

Ensayar otras pruebas que permitan determinar más a profundidad el efecto de diversos crioprotectores sobre la funcionabilidad espermática en la especie equina, que permitan mejorar los índices de gestación con el uso de semen congelado y que sean de utilidad a las asociaciones de criadores de caballos.

Analizar las respuestas a diversos crioprotectores para conservar y criopreservar semen equino desde el punto de vista de subpoblaciones espermáticas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loomis PR, (2006). Advanced Methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am. (Equine)* 22, 663–676.
2. Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH (1992) Determination of the relationship between sperm motility and fertility in stallions: 64 cases (1987- 1988). *J Am Vet Med Assoc* 197(3):389-394.
3. Blanchard TL, Varner DD, Schumacher JS (1998) Examination of the stallion for breeding soundness. En: *Manual of Equine Reproduction*, 3Edition. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher, Love CC, Hinrichs K, Hartman D (Eds.); Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, USA. 127-142.
4. Watson, P.F., (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Veterinary Record* 97, 12-15.
5. Morris, G.J., et al.(2007), Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 68(5): p. 804-12.
6. Morris, G.J.(2006), Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod*. 21(8): p. 2075-83
7. Ortega-Ferrusola, C., Maclás García, B., Suárez Rama, V., Gallardo-Bolaños, J., González-Fernández, L., Tapia, J., Rodríguez-Martinez, H., Peña, F.(2009), Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: Changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 419-423.
8. Barker, C.A. and J.C. Gandier (1957), Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Can J Comp Med Vet Sci*. 21(2): p. 47-51.
9. Samper JC, Morris CA (1998) Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903.
10. Metcalf ES. (2007). The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68, 423-28.

11. Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 107:276-292.
12. Loomis (2001) The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci* 68:191-200.
13. Arias Serrato, S., Andrade S., F., Federico C., I., et al. (2011). Aspectos de la eficiencia reproductiva correlacionados con el semental equino. *Revista Ciencia Animal*, 83 – 88.
14. Loomis PR, Graham JK (2008) Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci* 105:119–128.
15. Varner DD (2008) Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70:448-462.
16. Amann RP, Pickett BW (1987) Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7:145-173.
17. Alvarenga M A, Leao KM, Papa F O, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL, Gomes GM (2003) The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Proceedings of the Workshop on Transporting Gametes and Embryos – Havemeyer Foundation Monograph series* 12:74-76.
18. Benito, D., Alvarez, A., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C. y Serres, C. (2003). Análisis computerizado del semen de caballo de Pura Raza Española. IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal. Las Palmas, España.
19. Tischner M (1979) Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Reprod. Fertil* 27:53-59.
20. Brinsko SP, Crockett EG, Squires EL (2000) Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54:129-36.
21. Watson PF (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61, 481-492.

22. Stornelli MC., Tittarelli CM., Savignone CA., Stornelli MA. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal . *Analecta Veterinaria*. 25 (2): 28-35
23. Graham, J.K., 1996, Cryopreservation of stallion spermatozoa. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 12, 131-147.
24. Heitland AV, Jasko DJ: Squires EL, Graham JK, Pickett BW , Hamilton C (1996) Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Eq Vet J* 28:47-53
25. Loomis PR; Amann RP; Squires EL; Pickett BW, (1983). Fertility Of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA---lactose---egg Yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.* 56, 687---693.
26. Samper JC, Morris CA (1998) Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903
27. Samper J.C., (Ed.) (2000) Artificial insemination In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp 109–132.
28. Ball BA, Vo A.(2001). Tolerancia osmótica de los espermatozoides equinos y los efectos de los crioprotectores solubles sobre la motilidad, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides equinos. *J Androl.*; 22(6):1061-1069.
29. Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, et al. (2013). Estrés osmótico y cambios de fase de la membrana durante la congelación de espermatozoides de sementales: modo de acción de los agentes crioprotectores. *Biol Reprod.*; 88(3):68.
30. Macías García B, Ortega Ferrusola C, Aparicio IM, et al. (2012). Toxicidad del glicerol para los espermatozoides sementales: efectos sobre la integridad de la membrana y el citoesqueleto, la peroxidación lipídica y el potencial de membrana mitocondrial. *Teriogenología*. 77(7):1280-1289.
31. McGann LE. (1978). Diferentes acciones de agentes crioprotectores penetrantes y no penetrantes. *Criobiología*.; 15(4):382-390.

32. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, et al.(2004). Criobiología fundamental de células y tejidos reproductivos. *Criobiología.*; 48(2):146-156.
33. Fabbri R; Porcu E; Marsella T; Primavera MR; Seracchioli R; Ciotti PM; Magrini O; Venturoli S; Flamigni C, (1998). Oocyte cryopreservation. *Hum. Reprod.* 13(4), 98-108.
34. Keith SL (1998) Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine Spermatozoa. Tesis Doctoral, Colorado State University Fort Collins, EEUU. 104.
35. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, et al.(2005). Amidas como crioprotectores para congelar semen de sementales: una revisión. *Ciencia de la Reproducción Animal.* 2005; 89(1):105-113.
36. Buranaamnuay K; Grossfeld R; Struckmann C; Rath D, (2011). Influence Of cryoprotectans glicerol and amides, combined with antioxidant on quality of frozen-thawed boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 56-61.
37. Pace, M.M., Sullivan, J.J., Elliott, F.I., Graham, E.F., Coulter, G.H., 1981, Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5ml French straws. *J Anim Sci* 53, 693-701.
38. Tischner M (1979) Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Reprod Fertil* 27:53-59.
39. Palmer, E., Magistrini, M., 1992, Automated analysis of stallion semen postthaw motility. *Acta Vet Scand Suppl.* 88, 137-152.
40. Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M, Palmer E (2000) Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54: 907- 919
41. Ecot P; Decuadro- Hansen G; Delhomme G; Vidament M, (2005). Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 89,

42. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, et al. Criopreservación de espermatozoides: una revisión de 1996. *Actualización en Reproducción Humana*. 1996; 2(6):553-559.
43. Vishwanath R, Shannon P. Almacenamiento de semen bovino en estado líquido y congelado. *Ciencia de la Reproducción Animal*. 2000; 62(1-3):23-25.
44. Bailey JL, Blodeau JF, Cormier N. Criopreservación de semen en animales domésticos: un fenómeno dañino y capacitante. *Revista de Andrología*. 2000; 21(1):1-2.
45. Escuderos EL, Keith SL, Graham JK. Evaluación de crioprotectores alternativos para la preservación de espermatozoides de sementales. *Teriogenología*. 2004; 62(6):1056-1065.
46. Hoffmann B, Landeck A. Función endocrina testicular, estacionalidad y calidad del semen del semental. *Anim Reprod Sci*. 1999; 57(1-2):89-98.
47. Futino DO; Mendes MC; Matos WN; Mondadori RG; Lucci CM, (2010). Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 45,214 --220
48. Bianchi I; Calderam K; Maschio EF; Madeira EM; Da Rosa UR; Corcini CD; Bongalhardo DC; Correa EK; Lucia T Jr; Deschamps JC; Correa MN, (2008). Evaluation Of amides and centrifugation temperatura in boar semen cryopreservation. *Theriogenolog* 69, 632---638.
49. Tselutin K; Seigneurin F; Blesbois E, (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci.* 78, 586-590
50. Ogier De BB; Labbe C; Maisse G, (1999). Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology* 39, 177-184

51. Fahy GM; Lilley TH; Linsdell H; Douglas MS; Meryman HT, (1990). Cryoprotectant Toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27, 247-268
52. Alvarenga MA, Leao K M, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Squires EL (2000) Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction-Stockholm Abstracts* 2:157.
53. Squires EL; Keith SL; Graham JK, (2004). Evaluation Of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065.
54. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL (2005) Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 89:105-113
55. Graham JK, 2000. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Stockholm Abstracts* 2,3
56. Gomes GM; Jacob JCF; Medeiros ASL; Papa F; Alvarenga MA, 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 58, 277-279
57. Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58: 273-276.
58. Moffet PD; Bruemmer JE; Card C; Squires EL, 2003. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings Society For Theriogenology Annual Conference*, p.
59. Morillo Rodriguez, A., Balao da Silva, C., Macías-García, B., Gallardo Bolaños, J. M., Tapia, J. A., Aparicio, I. M., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2012). Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics of

- Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 47, Issue 6, pp. 995–1002). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02005.x>
60. Alvarenga, M. A., Leão, K. M., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L., & Gomes, G. M. (2003). The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph*, 12, 74–76.
61. Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, et al. Concentraciones óptimas de agentes crioprotectores para el semen de sementales que se clasifican como "buenos" o "malos" para la congelación. *Ciencia de la Reproducción Animal*. 2011; 125(1\20124):112\2012118.
62. Peña FJ, García BM, Samper JC, et al. Diseccionar el daño molecular de los espermatozoides de sementales: ¿la forma de mejorar los protocolos actuales de criopreservación? *Teriogenología*. 2011; 76(7):1177\20121186.
63. Uwland, J., 1984, Correlation between the number of inseminated spermatozoa and results of fertilization in dairy cattle. *Verband tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en de bevruchtingsresultaten bij melkvee*. 109, 405-412.
64. Mocé, E., Graham, J.K., 2008, In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.
65. Evenson, D.P., Wixon, R., 2006, Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 65, 979-991.
66. Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2007, Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations in Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 312-319.
67. Cabrera, V., Próspero, A., Pantoja, A., 2012, Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev. investig. Vet. Perú* vol.23, p.192-200.

68. Rubio-Guillén, J.L., Quintero-Moreno, A.A., González Villalobos, D.M., 2009, Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros 19, 382-389.
69. Drevious, L.O., Eriksson, H., 1966, Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research* 42, 136-156.
70. Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2003, Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.
71. Pérez-Llano, B., González, J.L., García-Casado, P., 1998b, Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar* 21, 6-7.
72. Vázquez, J.M., Martínez, E., Pastor, L.M., Roca, J., Matas, C., Calvo, A., 1996, Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: New lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochemica* 98, 93-100.
73. Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J., Blanco, O., Lucas, X., Matás, C., 1997, Utilización del analizador de imágenes para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides de verraco. *IV Simposium Internacional de Reproducción e Inseminación Artificial.*, 83-90.
74. Moura TCM, Arruda LCP, Araújo Silva RAJ, Silva RPF, Oliveira AS, Tobal LFM, Batista AM, Carneiro GF, Guerra MMP. El diluyente que contiene dimetilformamida añadido con sacarosa mejora la calidad in vitro después de congelar/descongelar el esperma de semental. *J Equine Vet Sci.* 2022 Feb;109:103825. doi: 10.1016/j.jevs.2021.103825. Epub 26 de noviembre de 2021. PMID: 34843891.
75. Ochoa G. JD. 2022. Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinación sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos. Tesis MVZ. Universidad de Cuenca. Ecuador.
76. Yáñez-Ortiz I., Catalán J., Rodríguez-Gi J.E., Miro, J., Yeste M. Avances en la criopreservación de espermatozoides en animales de granja: Bovinos,

- equinos, porcinos y ovinos. Ciencia de la Reproducción animal. Volumen 246, noviembre de 2022, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>.
77. Soni Y., Talluri T.R., Kumar A., Ravi S.K., Mehta J.S., Tripathi B.N.,. Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds. 2019. Criobiología. Volumen 86, febrero de 2019, páginas 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.12.005>.
78. Morillo Rodríguez A, Balao da Silva C, Macías-García B, Gallardo Bolaños JM, Tapia JA, Aparicio IM, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. La dimetilformamida mejora las características in vitro de los espermatozoides de sementales descongelados, reduciendo el daño subletal. *Reprod Domest Anim.* 2012 Dic; 47(6):995-1002. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02005.x. Epub 5 de marzo de 2012. PMID: 22384798.
79. Mesa A., Henao G., Parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. 2010. *Rev.MVZ Córdoba* 17(1):2908-2915, 2012
80. Gallo S., Vargas S., Orozco V., Evangelista. S., Santiani A. Criopreservación de semen de caballo Peruano de Paso utilizando Dimetilacetamida como agente crioprotector. *Spermova.* 2013; 3(1): 71 – 72
81. Neild N. Evaluación de la función de las membranas espermáticas equinas: Efecto de la criopreservación. *Spermova.* 2013; 3(2): 146 – 148
82. Dellepiane H, S. Chilge, D. Vexelman, A. Ugarelli, S. Evangelista, A. Santiani. Evaluación de la viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen refrigerado de Caballo Peruano de Paso. Reporte preliminar. *Spermova* 2015; 5(1): 38 -41
83. Samper JC, Morris CA (1998) Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903.
84. Palacios P, Peláez G, Soria M, Méndez S, Galarza-Álvarez L, Dorado J, Santiago-Moreno J, Galarza DA. La L-Carnitina mejora la cinemática y protege las membranas espermáticas de los espermatozoides de caballo

peruano de paso refrigerados y congelados. *Criobiología*. Junio de 2024;115:104884. doi: 10.1016/j.cryobiol.2024.104884. Epub 7 de marzo de 2024. PMID: 38460835.

85. Demick DS, Voss JL, Pickett BW. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *J Anim Sci* 1976; 43(3):633-7
86. Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7: 871-891.
87. Anchoroguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiol* 1987; 24:324-331.
88. Armitage WJ. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiol* 1986; 23:116-125.
89. Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistram C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 1987; 242:1-10.
90. Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 2002; 58:277-9.
91. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
92. Hempling HG, White S. Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiol* 1984; 21:133-143. 16. Hammerstedt, R.H., Graham, J
93. Neidermeyer W, Parish CR, Moor H. Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma* 1977; 92:177-193.
94. Boggs JM, Rangaraj G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phases induced by glycerol and polymyxin. *Biochim Biophys Acta* 1955; 816:221-233.

95. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983; 6 2:180-93.
96. Pineda. S. D. *Biología de la Reproducción en Animales Domésticos.*, Universidad de Nariño, Programa de Medicina Veterinaria, Pasto- Nariño. Capítulo 3, (1992), p. 88-92.
97. Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Háfiez, B. y Bellin, M.E. .2000. Semen evaluation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds), *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 365-375.
98. Björndahl, L., Barratt, C.L.R., Fraser, L.R., Kvist, U., Mortimer, D., 2002, ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: Immediate beneficial effects of standardized training. *Human Reproduction* 17, 1299-1305.
99. Briz, M.D., Bonet, S., Pinart, B., Egozcue, J., Camps, R., 1995, Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *Journal of Andrology* 16, 175-186.
100. Pinart, E., Sancho, S., Briz, M.D., Bonet, S., García, N., 1999, Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Animal Reproduction Science* 55, 269-278.
101. WHO 1999. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm Cervical Mucus Interaction*, Press, C.U., ed.
102. Jeyendran RS; Van der Ven HH; Zaneveld LJ. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl*; 39: 1279-1289.
103. Barriga, M.X. (2018) *Evaluación de Crioprotectores no Penetrantes: Proteínas de Baja Densidad (LDL) y Yema de Huevo de Gallina, en Calidad de Semen Refrigerado y Congelado de Caballos Peruano de Paso.* Tesis MVZ. UCSM. Peru.

104. Miro, Jordi & Martínez-Rodero, Iris & Yeste, Marc & Catalan, Jaime. (2025). Cryopreservation of Horse Sperm. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2897. 193-206. 10.1007/978-1-0716-4406-5_14.
105. Yanagimachi, R., Okada, A., Tung, K.S.K., 1981, Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. *Biology of Reproduction* 24, 512-518.
106. Davis, R.O., Siemers, R.J., 1995, Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7, 857-869.
107. Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., 2008b, Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science* 109, 27-39
108. Turner, R.M., 2003, Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility? *Journal of Andrology* 24, 790-803
109. Vantman, D., Banks, S.M., Koukoulis, G., Dennison, L., Sherins, R.J., 1989, Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyzer. *Fertility and Sterility* 51, 156-161.
110. Vantman, D., Gutiérrez, G., Madariaga, M., Ponce, J., Smith, R., 1994, Variability of seminal analysis and of objective parameters of sperm motility in semen during sperm capacitation in subjects with proved fertility. Variabilidad del análisis seminal y de los parámetros objetivos del movimiento espermático en semen y durante la capacitación espermática en individuos con fertilidad probada. 59, 197-202.
111. Samper, J.C. 2009d. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 51.
112. Samper, J.C. 2009c. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 59.
113. Hernández AC, Zambrano VJ, Jiménez EC. Current trends on stallion semen evaluation: what other methods can be used to improve our capacity for semen quality assessment?. *Journal of Veterinary Andrology*. 2019; 4(1): 01-19. [[Links](#)]

114. Gutiérrez, L.C. (2014). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. Tesis doctoral presentada para la obtención del Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
115. Davies, M. (2003). Equine reproductive Physiology, breeding and stud management. CABI. Pp 16 -24, 253 -259
116. Galina, C y Valencia, J. (2006). Reproduccion de animales domesticos. Limusa. . Pp. 403 -406.
117. Nevarez, L. (2011) Evaluación del comportamiento reproductivo de sementales cuarto de milla en un criadero en la Comarca Lagunera. Tesis para optar el Titulo de Médico Veterinario. México. Universidad Autónoma Agraria.
118. Ghallab A, Abou-Ahmed M, Fad A, El-Badry D, Shahat A, Moawad A. Optimization of the protocol for Cryopreservation of Arabian Stallion Spermatozoa: Effects of Centrifugation, Semen extenders and Cryoprotectans. *Cryoletters*. 2019; 40(2): 129-138. [[Links](#)]
119. Hurtgen, J.P. Evaluación del semental para la solidez reproductiva. *Vet. Clin. N. Am. Práctica equina*. 1992, 8, 149-165. [Google Académico] [Referencia cruzada]
120. Voss, J.L.; Pickett, B.W.; Squires, E.L. Morfología y motilidad de los espermatozoides y sus relaciones con la fertilidad. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1981, 178, 287-289. [Google Académico]
121. Schumacher J.; Moll HD. (2011) A Manual of Equine Diagnostic Procedures. Washington DC, Ed. TetonNewMedia. 181 p.
122. Dcunha R, Hussein RS, Ananda H, Kumari S, Adiga SK, Kannan N, Zhao Y y Kalthur G. 2022Perspectivas actuales y últimas actualizaciones sobre la motilidad de los espermatozoides y las aplicaciones asociadas en la reproducción asistida. *Ciencias de la Reproducción*, 297–25. (10.1007/s43032-020-00408-y) [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Académico][Lista de referencias]
123. Simon L y Lewis SE. 2011. Daño en el ADN de los espermatozoides o motilidad progresiva: ¿cuál es el mejor predictor de la fertilización in vitro? *Biología de Sistemas en Medicina Reproductiva* 57133–138. (

- 10.3109/19396368.2011.553984) [DOI] [PubMed] [Google Scholar][Lista de referencias]
124. Parlevliet JM, Kemp B y Colenbrander B. 1994Características reproductivas y calidad del semen en sementales holandeses de sangre caliente. *Revista de Reproducción y Fertilidad* 101183–187. (10.1530/jrf.0.1010183) [DOI] [PubMed] [Google Académico][Lista de referencias]
125. Colenbrander B, Gadella BM & Stout TA. 2003El valor predictivo del análisis de semen en la evaluación de la fertilidad de los sementales. *Reproducción en animales domésticos* 38305–311. (10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x) [DOI] [PubMed] [Google Académico][Lista de referencias]
126. Aurich J, Kuhl J, Tichy A & Aurich C. 2020Eficiencia de la criopreservación de semen en sementales. *Animals: An Open Access Journal from MDPI* 10 1033. (10.3390/ani10061033) [DOI] [Artículo gratuito de PMC] [PubMed] [Google Académico][Lista de referencias]
127. Florez-Rodriguez SA de Arruda RP, Alves MBR, Affonso FJ, Carvalho HF, Lemes KM, Lançoni R de Andrade AFC y Celeghini ECC. 2014Caracterización morfofuncional de espermatozoides enfriados con diferentes diluyentes para su uso en reproducción asistida por equinos. *Revista de Ciencia Veterinaria Equina* 34911–917. (10.1016/j.jevs.2014.04.007) [DOI] [Google Académico][Lista de referencias]
128. Cabrera, T, Ramires-Neto C, Belaz KRA, Freitas-Dell'aqua CP, Zampieri D, Tata A, Eberlin MN, Alvarenga MA & Souza FF. 2018Influencia del perfil lipídico espermatozoal en la criorresistencia de espermatozoides congelados de sementales. *Teriogenología* 108161-166. (10.1016/j.theriogenology.2017.11.025) [DOI] [PubMed] [Google Académico] [Lista de referencias]
129. Ortiz-Rodríguez JM, Martín-Cano FE, Ortega-Ferrusola C, Masot J, Redondo E, Gázquez A, Gil MC, Aparicio IM, Rojo-Domínguez P, Tapia JA et al. 2019La incorporación de cistina por la familia portadora soluble 7 miembro 11 (SLC7A11) es un componente del mecanismo regulador redox

- en los espermatozoides de sementales†. *Biología de la reproducción* 101208–222. (10.1093/biolre/ioz069) [DOI] [PubMed] [Google Académico][[Lista de referencias](#)]
130. Griffin RA, Swegen A, Baker M, Aitken RJ, Skerrett-Byrne DA, Rodriguez AS, Martín-Cano FE, Nixon B, Peña FJ, Delehede Met al. 2020La espectrometría de masas revela distintos perfiles proteómicos en espermatozoides de sementales de alta y baja calidad. *Reproducción* 160695-707. (10.1530/REP-20-0284) [DOI] [PubMed] [Google Académico][[Lista de referencias](#)]
131. Shakeel M, Jung H, Yoon D y Yoon M. 2022Cambios estacionales en la expresión de marcadores moleculares de células germinales de sementales. *Revista de Ciencia Veterinaria Equina* 118 104109. (10.1016/j.jevs.2022.104109) [DOI] [PubMed] [Google Académico][[Lista de referencias](#)]
132. Paccamonti, D.L., Buiten, A.V., Parlevliet, J.M., Colenbrander, B., 1999, Reproductive parameters of miniature stallions. *Theriogenology* 51, 1343-1349.
133. Bonet, S., Briz, M., Fradera, A., Egozcue, J., 1992, Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reproduction* 7, 523-528.1
134. Foote, R.H., Swierstra , E.E., Hunt, W.L., 1992, Spermatogenesis in the dog. *Anat Rec* 137, 341-354.
135. Wenkoff, M.S., 1975, The use of prostaglandins in reproduction. *Canadian Veterinary Journal* 16, 97-101.
136. Leib, Z., Bartoov, B., Eltes, F., Servadio, C., 1994, Reduced semen quality caused by chronic abacterial prostatitis: An enigma or reality? *Fertility and Sterility* 61, 1109-1116.
137. Amor, C.C.; Varner, D.D.; Thompson, J.A. Variación intra e intersemental en la morfología de los espermatozoides y su relación con la fertilidad. *J. Reprod. Fért. Supl.* 2000, 56, 93-100. [Google Académico]
138. Varner, D.D.; Johnson, L. Desde el punto de vista de un espermatozoide: revisando nuestra percepción de esta célula intrigante. En *Actas de la 53ª Convención Anual de la Asociación Americana de Profesionales Equinos*,

- Orlando, FL, EE.UU., 1-5 de diciembre de 2007; págs. 104-177. [[Google Académico](#)]
139. Ramalho-Santos, J.; Amaral, S. Mitochondrias y reproducción de mamíferos. *Mol. Célula. Endocrinol.* 2013, 379, 74–84. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)] [[Versión Verde](#)]
140. Sousa, A.P.; Amaral, A.; Baptista, M.; Tavares, R.; Campo, P.C.; Peregrín, P.C.; Freitas, A.; Paiva, A.; Almeida-Santos, T.; Ramalho-Santos, J. No todos los espermatozoides son iguales: las mitocondrias funcionales caracterizan una subpoblación de espermatozoides humanos con mejor potencial de fertilización. *PLoS ONE* 2011, 6, e18112. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)] [[Versión Verde](#)]
141. Galón, F.; Marchetti, C.; Jouy, N.; Marchetti, P. La funcionalidad de las mitocondrias diferencia a los espermatozoides humanos con alta y baja capacidad fertilizante. *Fétil. Estéril.* 2006, 86, 1526-1530. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)]
142. Marchetti, P.; Boleta, C.; Jouy, N.; Tomás, P.; Marchetti, C. Influencia del potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides en el resultado de la fertilización in vitro. *Andrologia* 2011, 44, 136–141. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)]
143. Samper, J., Pycock, J., McKinnon, A.(2007) “Current therapy in equine reproduction”. Saunders.. pp253-256
144. Pesch, S.; Bergmann, M. Estructura de los espermatozoides de mamíferos con respecto a la viabilidad, fertilidad y criopreservación. *Micron* 2006, 37, 597–612. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)]
145. Brito, L.F. Evaluación de la morfología del espermatozoides de semental. *Clin. Tech. Práctica equina.* 2007, 6, 249–264. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)]
146. Gravance, C.; Campeón, Z.; Liu, I.; Casey, P. Análisis de morfometría de la cabeza de los espermatozoides de muestras de semen de sementales eyaculados y desmontados. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 47, 149-155. [[Google Académico](#)] [[Referencia cruzada](#)]
147. Casey, P.; Gravance, C.; Davis, R.; Chabot, D.; Liu, I. Diferencias morfométricas en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides de

- sementales fértiles y subfértiles. *Theriogenology* 1997, 47, 575–582. [Google Académico] [Referencia cruzada]
148. Bedford, J. ¿Fertilización de mamíferos malinterpretada? Es poco probable que la penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida euteriana sea un evento lítico. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 1275-1287. [Google Académico] [Referencia cruzada] [PubMed] [Versión Verde]
149. Foster, J.A.; Gerton, G.L. La matriz acrosómica. *Adv. Anat. Embrión. Celda. Biol.* 2016, 220, 15–33. [Google Académico] [Referencia cruzada] [Versión Verde]
150. López, M.L.; De Souza, W. Distribución de complejos filipin-esteroles en la membrana plasmática de espermatozoides de sementales durante el proceso de maduración del epidídimo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 28, 158-168. [Google Académico] [Referencia cruzada] [PubMed]
151. García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. Importancia de la morfología de los espermatozoides durante el transporte y la fecundación de los espermatozoides en mamíferos. *Asiático J Androl.* 2016 Noviembre-Diciembre; 18(6):844-850. doi: 10.4103/1008-682X.186880. PMID: 27624988; PMCID: PMC5109874.
152. Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C., 2005, Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Veterinarni Medicina* 50, 24-32.
153. Love, C., Varner, D., Thompson, J., 2000;, Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* (56), 93-100.144. Sociedad
154. ACT. Hernández-Avilés C, Love C. Examen previo a la temporada de reproducción / precompra del semental: ecografía testicular, evaluación del semen y consideraciones. CT [Internet]. 1 de septiembre de 2021 [citado 26 de septiembre de 2025]; 13(3):289-98. Disponible en: <https://clinicaltheriogenology.net/index.php/CT/article/view/9102>
155. Samper, J.C. 2009e. Equine breeding management and artificial insemination, 2nd, ed., p. 62.
156. Dowsett, K.F., Osborne, H.G., Pattie, W.A., 1984, Morphological characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 22, 463-472.

157. Hoogewijs, M., Rijsselaere, T., De Vlieghe, S., Vanhaesebrouck, E., De Schauwer, C., Govaere, J., Thys, M., Hoflack, G., Van Soom, A., de Kruijff, A., 2010, Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74, 118-126.
158. Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hässig, M., 2003, Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60, 453-461.
159. Phetudomsinsuk, K., Sirinarumit, K., Laikul, A., Pinyopummin, A., 2008, Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica*
160. Dowsett, K.F., Knott, L.M., 1996, The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46, 397-412.
161. Gamboa, S., Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J., 2010, Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 73, 950-958.
162. Sousa, A.P.M., Gomes-Santos, C.S.S., Ramalho-Santos, J., 2006, Localization of SNAREs, NSF and Caveolin 1 in human spermatozoa: Relationship with seminal parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 52, 347-353
163. Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., FernándezSantos, M.R., Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2012, Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. *Theriogenology* 77, 1529-1539.
164. Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F., Bustos-Obregón, E., 2002, Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
165. Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., MartínezPastor, F., Garde, J.J., 2009, Identification of sperm-head morphometric subpopulations in iberian red deer epididymal sperm samples. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 206-211.
166. Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C., 2006, Morphometric classification of Spanish Thoroughbred stallion semen according to 160

- Bibliografía sperm head size measurements. *Animal Reproduction Science* 94, 2628.
167. Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005, Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology* 26, 716-723.
168. Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., 2001, Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology* 22, 382-394.
169. Pérez, F. and Pérez, F. 1985. Dilución del esperma. *Reproducción Animal Inseminación Artificial y Transplante de Embriones*. Editorial Científico-Médica, Barcelona, España. Capítulo 6: 215-249.
170. Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000, Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859-875.
171. Samper, J.C. 2009a. *Equine breeding management and artificial insemination*, 2nd, ed., p. 58.
172. Mocé, E., Graham, J.K., 2008, In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.7162.
173. Love, C.C., 2012, Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 464-466.7
174. Federación Ecuestre Alemana: Informe Anual 2019, Apéndice Estadísticas de Cría, página 7. [(consultado el 15 de mayo de 2020)]; Disponible en línea: https://www.pferd-aktuell.de/shop/index.php/cat/c135_Jahresberichte-FN---DOKR.html.
175. IFCE, Instituto Francés de Caballos y Equitación Estadísticas de Cría y Reproducción 2019. [(consultado el 19 de mayo de 2020)]; Disponible en línea: <https://statscheval.ifce.fr/>
176. Klug E., Treu H., Hillmann H., Heinze H. Resultados de la inseminación de yeguas con semen de semental fresco y congelado. *J. Reprod. Fért. Supl.* 1975; 23:107-110. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]

177. Amann R.P., Pickett B.W. Principios de criopreservación y una revisión de la criopreservación de espermatozoides de sementales. *J. Equine. Vet. Sci.* 1987; 7:145–173. doi: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4. [[DOI](#)] [[Google Académico](#)]
178. Aurich J.E., Kühne A., Hoppe H., Aurich C. El plasma seminal afecta la integridad de la membrana y la motilidad de los espermatozoides equinos después de la criopreservación. *Teriogenología.* 1996; 46:791–797. doi: 10.1016/S0093-691X(96)00237-3. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
179. Loomis P.R., Graham J.K. Congelación comercial de semen: variación masculina individual en la criosupervivencia y la respuesta del esperma de semental a protocolos de congelación personalizados. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 105:119–128. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.010. [[DOI](#)] [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
180. Aurich J, Kuhl J, Tichy A & Aurich C. 2020Eficiencia de la criopreservación de semen en sementales. *Animals: An Open Access Journal from MDPI* 10 1033. (10.3390/ani10061033) [[DOI](#)] [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
181. Santiani A, Evangelista-Vargas S, Vargas S, Gallo S, Ruiz L, Orozco V, Rosemberg M. Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *Andrologia.* 2017 Aug;49(6). doi: 10.1111/and.12672. Epub 2016 Aug 3. PMID: 27484577.
182. Alvarenga, M. A., Papa, F. O., y Neto, C. R. 2016. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice.* 32: 521–522.
183. Alvarez, C., Gil, L., Gonzalez, N., Olaciregui, M., & Luno, V. 2014. Equine sperm post thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. *Cryobiology*, 69: 144–148
184. Darr, C. R., Cortopassi, G. A., Datta, S., & Varner, D. D. 2016. Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoa health and varies with cryopreservation media. *Theriogenology*, 86: 1382–1382.

185. Moffett, P., Fors, G., & Graham, J. K. 2016. Cryopreservation of stallion sperm in freezing diluents containing glycerol alone or a combination of cryoprotectants. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43.
186. Darr, Christa R.; Moraes, Luis E.; Scanlan, Tawny N.; Baumber-Skaife, Julie; Loomis, Paul R.; Cortopassi, Gino A.; Meyers, Stuart A. (2016). *Sperm mitochondrial function is affected by stallion age and predicts post-thaw motility. Journal of Equine Veterinary Science*, (), S0737080616305445-. doi:10.1016/j.jevs.2016.10.015
187. Jasko, D. J., Moran, D. M., Farlin, M. E., Squires, E. L., Amann, R. P., & Pickett, B. W. 1992. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed semen. *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (USA)*. 38:649–652
188. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility whit cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 60:481–482.
189. Samper, J. C., Vidament, M., Katila, T., Newcombe, J., Estrada, A., & Sargeant, J. 2002. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: A multi-center study. *Theriogenolgy*, 58: 649–650.
190. Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, 89, 115–117.
191. 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. *Anim Reprod Sci* 125: 112-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.001> [[Links](#)]
192. Brum, A. M.; Sabeur, K. & Ball, B. A. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, 69(9):1041-55, 2008.
193. Atroshchenko, M. M. & Bragina, E. E. Change in the ultrastructure of stallion spermatozoa under the effect of cryopreservation. *Russ. Agr. Sci.*, 37(2):175-8, 2011.

194. Burnaugh, L.; Sabeur, K. & Ball, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*, 67(3):580-9, 2007.
195. Hammerstedt, R., & Graham, J. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29 (1): 26-38.
196. Gilmore, J., Mcgann, L., Liu, J., Gao, D., Peter, A., Kleinhans, F. & Critser, J. 1995. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of reproduction* 53 (5): 985-995
197. Henry M, Snoeck PPN, Cottorello ACP. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 2002; 58:245-48.
198. Picket, B. W., & Amann, R. P. (1993). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 9(1), 205-218.
199. Pommer, A. C., et al. (2003). Effect of cryoprotectants on stallion sperm membrane fluidity. *Journal of Andrology*, 24(1), 115-123.
200. Neuhauser, S., et al. (2018). Comparative analysis of cryodamage induced by glycerol and DMF in stallion sperm acrosome. *Theriogenology*, 115, 108-115.
201. Ball, B. A., & Vo, A. T. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant status in stallion semen during cryopreservation with different cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(5), 275-280.
202. Ortega-Ferrusola, C., et al. (2017). Differences in mitochondrial membrane potential of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol or DMF. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 22-28.
203. Varela Junior, A. S., et al. (2019). Sperm DNA fragmentation in stallions: comparison between glycerol and DMF as cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 255-260.
204. Crockett, E. C., et al. (2001). Permeability coefficients of cryoprotectants for stallion sperm. *Cryobiology*, 43(2), 184-192.

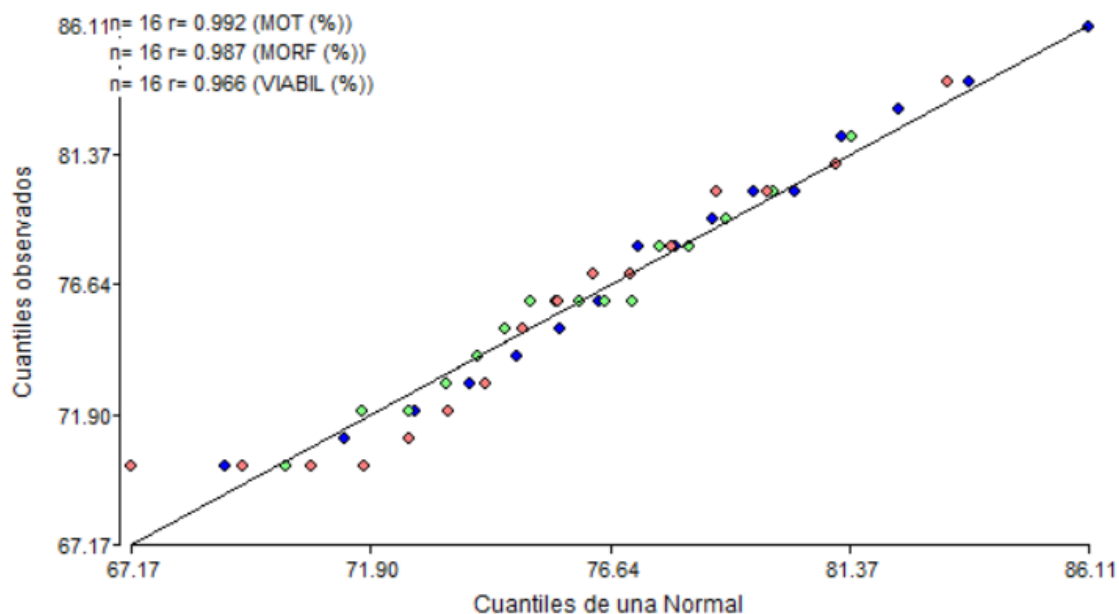


Anexo 1.

Cálculos y gráficos estadísticos del análisis de datos

Figura 19.

Viabilidad espermática del semen fresco



QQ-Plot mezcaldo de la motilidad, morfología normal y normalidad.

Prueba de Bondad de Ajuste para la motilidad, morfología normal y viabilidad espermática del semen fresco

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
MOT (%)	16	77.56	4.83	0.94	0.5976
MORF (%)	16	75.81	3.17	0.97	0.8711
VIABIL (%)	16	75.25	4.57	0.88	0.0913

Tablas de distribución de frecuencias para la motilidad, morfología normal y viabilidad espermática del semen fresco

Tablas de frecuencias

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
MOT (%)	1	[70.00	74.00]	72.00	5	0.31	5	0.31
MOT (%)	2	(74.00	78.00)	76.00	4	0.25	9	0.56
MOT (%)	3	(78.00	82.00)	80.00	4	0.25	13	0.81
MOT (%)	4	(82.00	86.00)	84.00	3	0.19	16	1.00

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
MORF (%)	1	[70.00	73.00]	71.50	4	0.25	4	0.25
MORF (%)	2	(73.00	76.00)	74.50	7	0.44	11	0.69
MORF (%)	3	(76.00	79.00)	77.50	3	0.19	14	0.88
MORF (%)	4	(79.00	82.00)	80.50	2	0.13	16	1.00

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
VIABIL (%)	1	[70.00	73.50]	71.75	7	0.44	7	0.44
VIABIL (%)	2	(73.50	77.00)	75.25	4	0.25	11	0.69
VIABIL (%)	3	(77.00	80.50)	78.75	3	0.19	14	0.88
VIABIL (%)	4	(80.50	84.00)	82.25	2	0.13	16	1.00



Figura 20.

Histogramas, con ajuste de la curva normal de la motilidad, morfología normal y viabilidad espermática del semen fresco

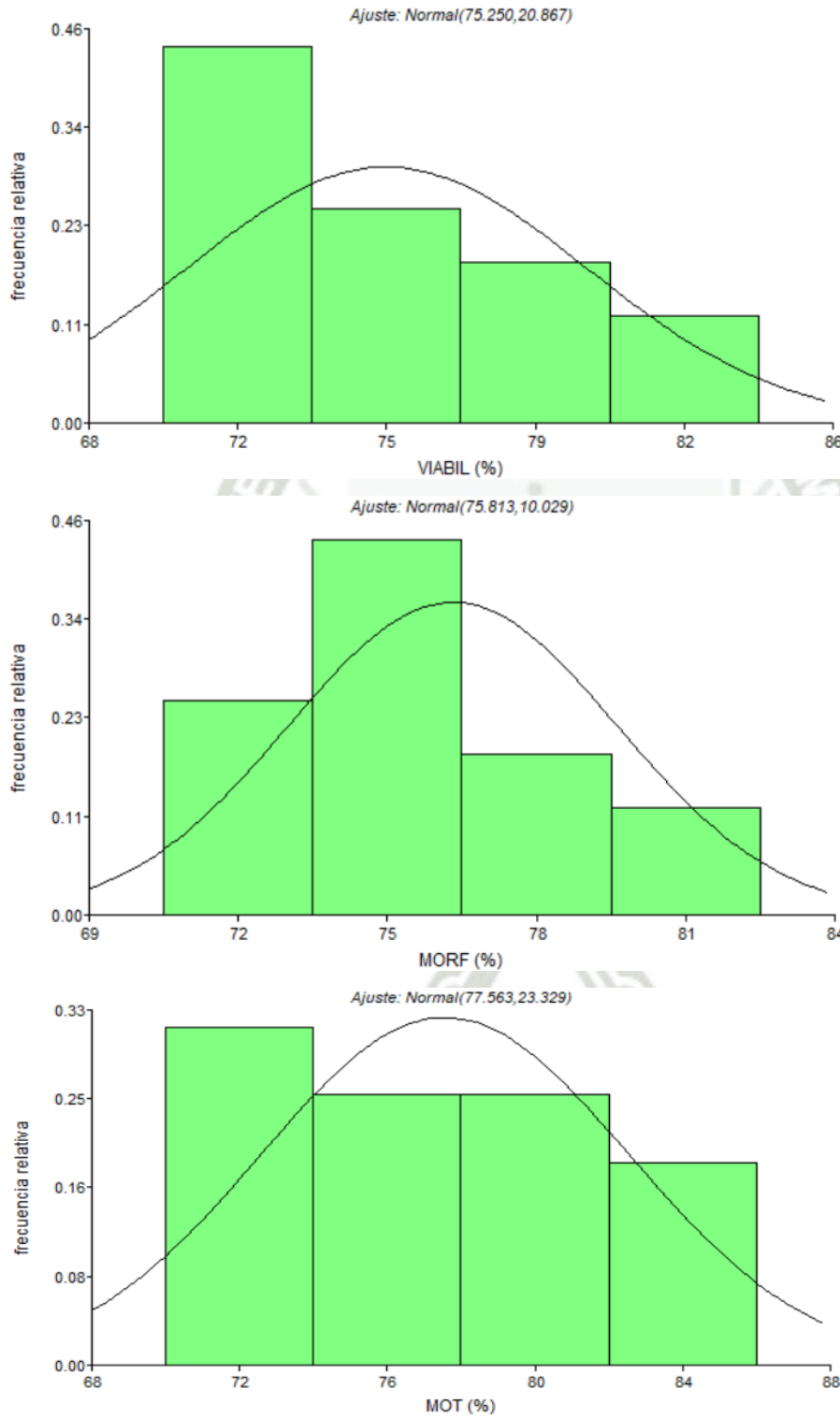
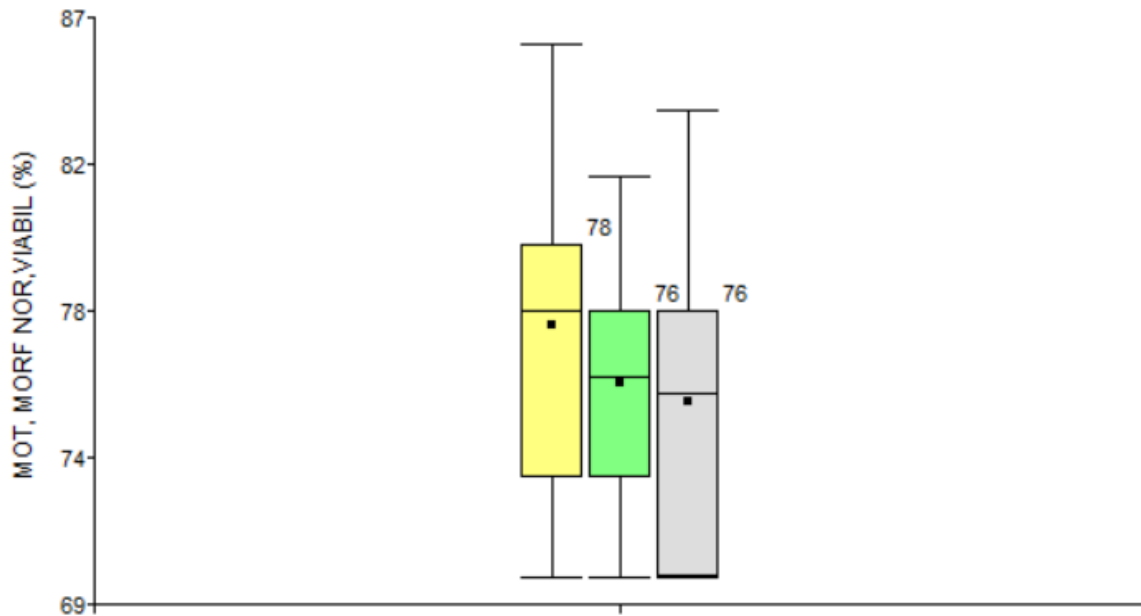


Figura 21.

Box-Plot comparando las medidas de resumen de la motilidad, morfología normal y viabilidad espermática del semen fresco de caballo Peruano de Paso.



Anexo 2.

Comparación de las medidas de resumen de los dilutores con DMF y GLY

Variable	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%	43.81	2.23	4.96	0.56	5.08	40.00	48.00	43.50	42.00	45.00	0.23	-0.78
DMF2%	44.56	2.45	6.00	0.61	5.49	40.00	48.00	44.50	43.00	46.00	-0.26	-0.99
DMF3%	41.69	3.18	10.10	0.79	7.62	36.00	46.00	42.00	39.00	45.00	-0.22	-1.33
DMF4%	38.06	2.17	4.73	0.54	5.71	35.00	42.00	38.00	36.00	40.00	0.18	-1.12
GLY1%	40.69	2.30	5.30	0.58	5.66	38.00	45.00	40.00	39.00	42.00	0.59	-0.97
GLY2%	42.24	7.31	53.44	1.77	17.31	34.00	69.00	41.00	40.00	43.00	3.34	9.05
GLY3%	38.00	3.43	11.73	0.86	9.01	32.00	42.00	38.00	35.00	41.00	-0.32	-1.29
GLY4%	34.94	2.59	6.73	0.65	7.42	31.00	39.00	34.50	33.00	37.00	-3.1E-04	-1.21
DMF1%1	71.56	3.42	11.73	0.86	4.79	65.00	78.00	71.50	69.00	73.00	-0.07	-0.13
DMF2%1	72.50	2.53	6.40	0.63	3.49	70.00	79.00	72.00	70.00	73.00	1.24	0.73
DMF3%1	70.88	4.11	16.92	1.03	5.80	64.00	78.00	71.50	68.00	73.00	-0.30	-0.66
DMF4%1	69.19	4.00	16.03	1.00	5.79	60.00	77.00	70.00	66.00	71.00	-0.26	0.49
GLY1%1	69.38	3.28	10.78	0.82	4.73	63.00	76.00	70.00	67.00	71.00	-0.21	-0.05
GLY2%1	71.19	2.17	4.70	0.54	3.04	68.00	77.00	71.00	70.00	71.00	1.52	1.80
GLY3%1	69.13	3.84	14.78	0.96	5.56	62.00	76.00	70.00	66.00	71.00	-0.37	-0.50
GLY4%1	67.31	4.29	18.36	1.07	6.37	58.00	74.00	68.00	65.00	70.00	-0.48	-0.27
DMF1%2	43.06	2.05	4.20	0.51	4.76	39.00	47.00	43.00	42.00	44.00	0.12	-0.34
DMF2%2	44.25	2.14	4.60	0.54	4.85	40.00	47.00	45.00	43.00	46.00	-0.51	-0.90
DMF3%2	40.63	3.20	10.25	0.80	7.88	35.00	45.00	40.50	38.00	43.00	-0.15	-1.19
DMF4%2	37.31	2.36	5.56	0.59	6.32	33.00	42.00	37.50	36.00	39.00	0.02	-0.53
GLY1%2	41.38	2.06	4.25	0.52	4.98	37.00	45.00	41.00	40.00	43.00	-0.06	-0.36
GLY2%2	42.69	2.02	4.10	0.51	4.74	39.00	46.00	43.00	41.00	44.00	-0.12	-0.97
GLY3%2	39.00	2.68	7.20	0.67	6.88	34.00	44.00	38.50	37.00	41.00	0.21	-0.60
GLY4%2	35.25	2.54	6.47	0.64	7.21	30.00	40.00	35.50	33.00	37.00	-0.07	-0.28

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%	16	43.81	2.23	4.96	0.56	5.08	40.00	48.00	43.50	42.00	45.00	0.23	-0.78
GLY1%	16	40.69	2.30	5.30	0.58	5.66	38.00	45.00	40.00	39.00	42.00	0.59	-0.97
DMF2%	16	44.56	2.45	6.00	0.61	5.49	40.00	48.00	44.50	43.00	46.00	-0.26	-0.99
GLY2%	17	42.24	7.31	53.44	1.77	17.31	34.00	69.00	41.00	40.00	43.00	3.34	9.05
DMF3%	16	41.69	3.18	10.10	0.79	7.62	36.00	46.00	42.00	39.00	45.00	-0.22	-1.33
GLY3%	16	38.00	3.43	11.73	0.86	9.01	32.00	42.00	38.00	35.00	41.00	-0.32	-1.29
DMF4%	16	38.06	2.17	4.73	0.54	5.71	35.00	42.00	38.00	36.00	40.00	0.18	-1.12
GLY4%	16	34.94	2.59	6.73	0.65	7.42	31.00	39.00	34.50	33.00	37.00	-3.1E-04	-1.21

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%1	16	71.56	3.42	11.73	0.86	4.79	65.00	78.00	71.50	69.00	73.00	-0.07	-0.13
GLY1%1	16	69.38	3.28	10.78	0.82	4.73	63.00	76.00	70.00	67.00	71.00	-0.21	-0.05
DMF2%1	16	72.50	2.53	6.40	0.63	3.49	70.00	79.00	72.00	70.00	73.00	1.24	0.73
GLY2%1	16	71.19	2.17	4.70	0.54	3.04	68.00	77.00	71.00	70.00	71.00	1.52	1.80
DMF3%1	16	70.88	4.11	16.92	1.03	5.80	64.00	78.00	71.50	68.00	73.00	-0.30	-0.66
GLY3%1	16	69.13	3.84	14.78	0.96	5.56	62.00	76.00	70.00	66.00	71.00	-0.37	-0.50
DMF4%1	16	69.19	4.00	16.03	1.00	5.79	60.00	77.00	70.00	66.00	71.00	-0.26	0.49
GLY4%1	16	67.31	4.29	18.36	1.07	6.37	58.00	74.00	68.00	65.00	70.00	-0.48	-0.27

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%2	16	43.06	2.05	4.20	0.51	4.76	39.00	47.00	43.00	42.00	44.00	0.12	-0.34
GLY1%2	16	41.38	2.06	4.25	0.52	4.98	37.00	45.00	41.00	40.00	43.00	-0.06	-0.36
DMF2%2	16	44.25	2.14	4.60	0.54	4.85	40.00	47.00	45.00	43.00	46.00	-0.51	-0.90
GLY2%2	16	42.69	2.02	4.10	0.51	4.74	39.00	46.00	43.00	41.00	44.00	-0.12	-0.97
DMF3%2	16	40.63	3.20	10.25	0.80	7.88	35.00	45.00	40.50	38.00	43.00	-0.15	-1.19
GLY3%2	16	39.00	2.68	7.20	0.67	6.88	34.00	44.00	38.50	37.00	41.00	0.21	-0.60
DMF4%2	16	37.31	2.36	5.56	0.59	6.32	33.00	42.00	37.50	36.00	39.00	0.02	-0.53
GLY4%2	16	35.25	2.54	6.47	0.64	7.21	30.00	40.00	35.50	33.00	37.00	-0.07	-0.28

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
DMF1%2	16	43.06	2.05	41.97	44.15	84.09	<0.0001
GLY1%2	16	41.38	2.06	40.28	42.47	80.28	<0.0001
DMF2%2	17	44.29	2.08	43.22	45.37	87.61	<0.0001
GLY2%2	16	42.69	2.02	41.61	43.77	84.37	<0.0001
DMF3%2	16	40.63	3.20	38.92	42.33	50.76	<0.0001
GLY3%2	16	39.00	2.68	37.57	40.43	58.14	<0.0001
DMF4%2	16	37.31	2.36	36.06	38.57	63.28	<0.0001
GLY4%2	16	35.25	2.54	33.89	36.61	55.45	<0.0001



Anexo 3.

Análisis de la varianza de los dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática

Análisis de la varianza

GLY1%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY1%	48	0.97	0.96	5.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8576.08	3	2858.69	416.64	<0.0001
Evaluacion Espermtica	8576.08	3	2858.69	416.64	<0.0001
Error	301.90	44	6.86		
Total	8877.98	47			

GLY2%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY2%	48	0.98	0.97	4.40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9358.50	3	3119.50	608.75	<0.0001
Evaluacion Espermtica	9358.50	3	3119.50	608.75	<0.0001
Error	225.47	44	5.12		
Total	9583.98	47			



GLY3%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY3%	48	0.95	0.95	6.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10038.83	3	3346.28	307.33	<0.0001
Evaluacion Espermtica	10038.83	3	3346.28	307.33	<0.0001
Error	479.08	44	10.89		
Total	10517.92	47			

GLY4%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLY4%	48	0.96	0.96	7.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11089.83	3	3696.61	356.04	<0.0001
Evaluacion Espermtica	11089.83	3	3696.61	356.04	<0.0001
Error	456.84	44	10.38		
Total	11546.67	47			

Análisis de la varianza

DMF1%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF1%	48	0.96	0.96	5.05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8442.70	3	2814.23	396.11	<0.0001
Evaluacion espermatoca	8442.70	3	2814.23	396.11	<0.0001
Error	312.61	44	7.10		
Total	8755.31	47			

DMF2%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF2%	48	0.97	0.97	4.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8425.88	3	2808.63	497.10	<0.0001
Evaluacion espermatoca	8425.88	3	2808.63	497.10	<0.0001
Error	248.60	44	5.65		
Total	8674.48	47			

DMF3%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF3%	48	0.94	0.94	6.93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		9437.58	3	3145.86	251.11	<0.0001
Evaluacion espermatica		9437.58	3	3145.86	251.11	<0.0001
Error		551.23	44	12.53		
Total		9988.81	47			

DMF4%

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DMF4%	48	0.96	0.96	6.18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		10593.04	3	3531.01	398.09	<0.0001
Evaluacion espermatica		10593.04	3	3531.01	398.09	<0.0001
Error		390.28	44	8.87		
Total		10983.31	47			

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.19	0.17	8.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo		374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Concncracion %		374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Error		1609.78	124	12.98		
Total		1984.30	127			

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Moti sem des %	128	0.00	3.56	0.96	0.0032

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Moti sem des %	128	0.03	0.01	80.71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21.87	3	7.29	1.47	0.2256
Concncnacion %	21.87	3	7.29	1.47	0.2256
Error	614.40	124	4.95		
Total	636.27	127			

Homogeneidad de varianzas

Levene

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.19	0.17	8.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Concncnacion %	374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Error	1609.78	124	12.98		
Total	1984.30	127			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.31800

Error: 12.9821 gl: 124

Concncnacion %	Medias	n	E.E.	
4	37.59	32	0.64	A
3	40.03	32	0.64	B
2	41.69	32	0.64	B
1	41.84	32	0.64	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 4.

Test de Tukey de los dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.19	0.17	8.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Concnracion %	374.52	3	124.84	9.62	<0.0001
Error	1609.78	124	12.98		
Total	1984.30	127			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.31800

Error: 12.9821 gl: 124

Concnracion %	Medias	n	E.E.
1	41.84	32	0.64 A
2	41.69	32	0.64 A
3	40.03	32	0.64 A
4	37.59	32	0.64 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.36	0.35	7.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	720.57	2	360.29	35.64	<0.0001	
Crioprotector	388.51	1	388.51	38.43	<0.0001	
Concnracion %	332.06	1	332.06	32.85	<0.0001	-1.44
Error	1263.73	125	10.11			
Total	1984.30	127				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.10299

Error: 10.1099 gl: 125

Crioprotector	Medias	n	E.E.
1	42.03	64	0.40 A
2	38.55	64	0.40 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5.

Comparación de semen fresco versus semen posdescongelamiento dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática

Resumen Mot sem fre%	
Media	77.56
D.E.	4.83
CV	6.23

Resumen Morf sem fre%	
Media	75.81
D.E.	3.17
CV	4.18

Resumen Viab sem fre%	
Media	75.25
D.E.	4.57
CV	6.07

Resumen	DMF1%	DMF2%	DMF3%	DMF4%
Media	43.81	44.56	41.69	38.06
D.E.	2.23	2.45	3.18	2.17
CV	5.08	5.49	7.62	5.71

Resumen	DMF1%1	DMF2%1	DMF3%1	DMF4%1
Media	71.56	72.50	70.88	69.19
D.E.	3.42	2.53	4.11	4.00
CV	4.79	3.49	5.80	5.79

Resumen	DMF1%2	DMF2%2	DMF3%2	DMF4%2
Media	43.06	44.25	40.63	37.31
D.E.	2.05	2.14	3.20	2.36
CV	4.76	4.85	7.88	6.32

Resumen	GLY1%	GLY2%	GLY3%	GLY4%
Media	40.69	40.56	38.00	34.94
D.E.	2.30	2.50	3.43	2.59
CV	5.66	6.17	9.01	7.42

Resumen	GLY1%1	GLY2%1	GLY3%1	GLY4%1
Media	69.38	71.19	69.13	67.31
D.E.	3.28	2.17	3.84	4.29
CV	4.73	3.04	5.56	6.37

Resumen	GLY1%2	GLY2%2	GLY3%2	GLY4%2
Media	41.38	42.69	39.00	35.25
D.E.	2.06	2.02	2.68	2.54
CV	4.98	4.74	6.88	7.21

Anexo 6.

Plantilla de datos obtenidos para la motilidad, morfología y viabilidad
espermática

Rep	Conc %	Viab des %	Caballo	Crioprotector	RDUO Morf sem des %	RABS Morf sem des %
1	1	42	1	1	-1.45	1.45
2	1	45	1	1	1.55	1.55
3	1	47	1	1	3.55	3.55
4	1	45	1	1	1.55	1.55
1	2	46	1	1	3.97	3.97
2	2	47	1	1	4.97	4.97
3	2	43	1	1	0.97	0.97
4	2	41	1	1	-1.03	1.03
1	3	45	1	1	4.4	4.4
2	3	40	1	1	-0.6	0.6
3	3	43	1	1	2.4	2.4
4	3	44	1	1	3.4	3.4
1	4	39	1	1	-0.17	0.17
2	4	36	1	1	-3.17	3.17
3	4	40	1	1	0.83	0.83
4	4	42	1	1	2.83	2.83
1	1	39	2	1	-4.45	4.45
2	1	42	2	1	-1.45	1.45
3	1	41	2	1	-2.45	2.45
4	1	42	2	1	-1.45	1.45
1	2	43	2	1	0.97	0.97
2	2	46	2	1	3.97	3.97
3	2	43	2	1	0.97	0.97
4	2	42	2	1	-0.03	0.03
1	3	43	2	1	2.4	2.4
2	3	45	2	1	4.4	4.4
3	3	44	2	1	3.4	3.4
4	3	42	2	1	1.4	1.4
1	4	39	2	1	-0.17	0.17
2	4	36	2	1	-3.17	3.17
3	4	39	2	1	-0.17	0.17
4	4	38	2	1	-1.17	1.17
1	1	44	3	1	0.55	0.55
2	1	43	3	1	-0.45	0.45
3	1	46	3	1	2.55	2.55
4	1	41	3	1	-2.45	2.45
1	2	46	3	1	3.97	3.97
2	2	47	3	1	4.97	4.97
3	2	43	3	1	0.97	0.97
4	2	45	3	1	2.97	2.97
1	3	39	3	1	-1.6	1.6
2	3	38	3	1	-2.6	2.6
3	3	38	3	1	-2.6	2.6
4	3	41	3	1	0.4	0.4
1	4	36	3	1	-3.17	3.17
2	4	34	3	1	-5.17	5.17
3	4	38	3	1	-1.17	1.17
4	4	36	3	1	-3.17	3.17
1	1	43	4	1	-0.45	0.45
2	1	43	4	1	-0.45	0.45
3	1	42	4	1	-1.45	1.45
4	1	44	4	1	0.55	0.55
1	2	45	4	1	2.97	2.97
2	2	45	4	1	2.97	2.97
3	2	46	4	1	3.97	3.97
4	2	40	4	1	-2.03	2.03
1	3	39	4	1	-1.6	1.6
2	3	36	4	1	-4.6	4.6
3	3	38	4	1	-2.6	2.6
4	3	35	4	1	-5.6	5.6
1	4	39	4	1	-0.17	0.17
2	4	37	4	1	-2.17	2.17

Rep	Conc %	Viab des %	Caballo	Crioprotector	RDUO Morf sem des %	RABS Morf sem des %
3	4	35	4	1	-4.17	4.17
4	4	33	4	1	-6.17	6.17
1	1	40	1	2	-1.72	1.72
2	1	44	1	2	2.28	2.28
3	1	45	1	2	3.28	3.28
4	1	40	1	2	-1.72	1.72
1	2	45	1	2	4.71	4.71
2	2	43	1	2	2.71	2.71
3	2	41	1	2	0.71	0.71
4	2	39	1	2	-1.29	1.29
1	3	37	1	2	-1.86	1.86
2	3	39	1	2	0.14	0.14
3	3	41	1	2	2.14	2.14
4	3	43	1	2	4.14	4.14
1	4	37	1	2	-0.44	0.44
2	4	34	1	2	-3.44	3.44
3	4	39	1	2	1.56	1.56
4	4	40	1	2	2.56	2.56
1	1	37	1	2	-4.72	4.72
2	2	40	2	2	-0.29	0.29
3	3	40	2	2	1.14	1.14
4	4	41	2	2	3.56	3.56
1	1	41	2	2	-0.72	0.72
2	2	43	2	2	2.71	2.71
3	3	43	2	2	4.14	4.14
4	4	40	2	2	2.56	2.56
1	1	42	2	2	0.28	0.28
2	2	44	2	2	3.71	3.71
3	3	41	2	2	2.14	2.14
4	4	40	2	2	2.56	2.56
1	1	37	2	2	-4.72	4.72
2	2	33	2	2	-7.29	7.29
3	3	36	2	2	-2.86	2.86
4	4	37	2	2	-0.44	0.44
1	1	43	2	2	1.28	1.28
2	2	42	3	2	1.71	1.71
3	3	44	3	2	5.14	5.14
4	4	40	3	2	2.56	2.56
1	1	45	3	2	3.28	3.28
2	2	44	3	2	3.71	3.71
3	3	43	3	2	4.14	4.14
4	4	41	3	2	3.56	3.56
1	1	37	3	2	-4.72	4.72
2	2	39	3	2	-1.29	1.29
3	3	38	3	2	-0.86	0.86
4	4	38	3	2	0.56	0.56
1	1	33	3	2	-8.72	8.72
2	2	35	3	2	-5.29	5.29
3	3	36	3	2	-2.86	2.86
4	4	33	3	2	-4.44	4.44
1	1	43	3	2	1.28	1.28
2	2	41	4	2	0.71	0.71
3	3	40	4	2	1.14	1.14
4	4	42	4	2	4.56	4.56
1	1	46	4	2	4.28	4.28
2	2	43	4	2	2.71	2.71
3	3	45	4	2	6.14	6.14
4	4	41	4	2	3.56	3.56
1	1	38	4	2	-3.72	3.72
2	2	36	4	2	-4.29	4.29
3	3	37	4	2	-1.86	1.86
4	4	34	4	2	-3.44	3.44
1	1	36	4	2	-5.72	5.72
2	2	33	4	2	-7.29	7.29
3	3	35	4	2	-3.86	3.86
4	4	30	4	2	-7.44	7.44

Repetición	Concentración %	Motivaciones %	Caballo	Crioprotector	RDUO Motivaciones %	RE Motivaciones %	RABS Motivaciones %
1	1	45	1	1	3.16	0.89	3.16
2	1	46	1	1	4.16	1.17	4.16
3	1	48	1	1	6.16	1.74	6.16
4	1	46	1	1	4.16	1.17	4.16
1	2	48	1	1	6.31	1.78	6.31
2	2	47	1	1	5.31	1.5	5.31
3	2	43	1	1	1.31	0.37	1.31
4	2	41	1	1	-0.69	-0.19	0.69
1	3	46	1	1	5.97	1.68	5.97
2	3	41	1	1	0.97	0.27	0.97
3	3	44	1	1	3.97	1.12	3.97
4	3	45	1	1	4.97	1.4	4.97
1	4	40	1	1	2.41	0.68	2.41
2	4	36	1	1	-1.59	-0.45	1.59
3	4	41	1	1	3.41	0.96	3.41
4	4	42	1	1	4.41	1.24	4.41
1	1	40	2	1	-1.84	-0.52	1.84
2	1	42	2	1	0.16	0.04	0.16
3	1	42	2	1	0.16	0.04	0.16
4	1	43	2	1	1.16	0.33	1.16
1	2	44	2	1	2.31	0.65	2.31
2	2	46	2	1	4.31	1.22	4.31
3	2	43	2	1	1.31	0.37	1.31
4	2	43	2	1	1.31	0.37	1.31
1	3	45	2	1	4.97	1.4	4.97
2	3	45	2	1	4.97	1.4	4.97
3	3	45	2	1	4.97	1.4	4.97
4	3	43	2	1	2.97	0.84	2.97
1	4	39	2	1	1.41	0.4	1.41
2	4	36	2	1	-1.59	-0.45	1.59
3	4	40	2	1	2.41	0.68	2.41
4	4	38	2	1	0.41	0.11	0.41
1	1	45	3	1	3.16	0.89	3.16
2	1	44	3	1	2.16	0.61	2.16
3	1	47	3	1	5.16	1.45	5.16
4	1	41	3	1	-0.84	-0.24	0.84
1	2	46	3	1	4.31	1.22	4.31
2	2	48	3	1	6.31	1.78	6.31
3	2	42	3	1	0.31	0.09	0.31
4	2	44	3	1	2.31	0.65	2.31
1	3	43	3	1	2.97	0.84	2.97
2	3	40	3	1	-0.03	-0.01	0.03
3	3	38	3	1	-2.03	-0.57	2.03
4	3	40	3	1	-0.03	-0.01	0.03
1	4	37	3	1	-0.59	-0.17	0.59

Repetición	Concentración %	Motivaciones %	Caballo	Crioprotector	RDUO Motivaciones %	RE Motivaciones %	RABS Motivaciones %
2	4	35	3	1	-2.59	-0.73	2.59
3	4	39	3	1	1.41	0.4	1.41
4	4	38	3	1	0.41	0.11	0.41
1	1	43	4	1	1.16	0.33	1.16
2	1	42	4	1	0.16	0.04	0.16
3	1	43	4	1	1.16	0.33	1.16
4	1	44	4	1	2.16	0.61	2.16
1	2	45	4	1	3.31	0.93	3.31
2	2	46	4	1	4.31	1.22	4.31
3	2	47	4	1	5.31	1.5	5.31
4	2	40	4	1	-1.69	-0.48	1.69
1	3	39	4	1	-1.03	-0.29	1.03
2	3	38	4	1	-2.03	-0.57	2.03
3	3	39	4	1	-1.03	-0.29	1.03
4	3	36	4	1	-4.03	-1.14	4.03
1	4	40	4	1	2.41	0.68	2.41
2	4	37	4	1	-0.59	-0.17	0.59
3	4	36	4	1	-1.59	-0.45	1.59
4	4	35	4	1	-2.59	-0.73	2.59
1	1	43	1	2	1.16	0.33	1.16
2	1	44	1	2	2.16	0.61	2.16
3	1	45	1	2	3.16	0.89	3.16
4	1	44	1	2	2.16	0.61	2.16
1	2	44	1	2	2.31	0.65	2.31
2	2	43	1	2	1.31	0.37	1.31
3	2	40	1	2	-1.69	-0.48	1.69
4	2	38	1	2	-3.69	-1.04	3.69
1	3	40	1	2	-0.03	-0.01	0.03
2	3	39	1	2	-1.03	-0.29	1.03
3	3	41	1	2	0.97	0.27	0.97
4	3	42	1	2	1.97	0.56	1.97
1	4	38	1	2	0.41	0.11	0.41
2	4	34	1	2	-3.59	-1.01	3.59
3	4	39	1	2	1.41	0.4	1.41
4	4	38	1	2	0.41	0.11	0.41
1	1	38	1	2	-3.84	-1.08	3.84
2	2	40	2	2	-1.69	-0.48	1.69
3	3	39	2	2	-1.03	-0.29	1.03
4	4	40	2	2	2.41	0.68	2.41
1	1	40	2	2	-1.84	-0.52	1.84
2	2	41	2	2	-0.69	-0.19	0.69
3	3	39	2	2	-1.03	-0.29	1.03
4	4	40	2	2	2.41	0.68	2.41
1	1	41	2	2	-0.84	-0.24	0.84
2	2	42	2	2	0.31	0.09	0.31

Repetición	Concentración %	Motivaciones %	Caballo	Crioprotector	RDUO Motivaciones %	RE Motivaciones %	RABS Motivaciones %
3	3	41	2	2	0.97	0.27	0.97
4	4	42	2	2	4.41	1.24	4.41
1	1	35	2	2	-6.84	-1.93	6.84
2	2	34	2	2	-7.69	-2.17	7.69
3	3	38	2	2	-2.03	-0.57	2.03
4	4	33	2	2	-4.59	-1.3	4.59
1	1	41	2	2	-0.84	-0.24	0.84
2	2	41	3	2	-0.69	-0.19	0.69
3	3	42	3	2	1.97	0.56	1.97
4	4	38	3	2	0.41	0.11	0.41
1	1	42	3	2	0.16	0.04	0.16
2	2	44	3	2	2.31	0.65	2.31
3	3	39	3	2	-1.03	-0.29	1.03
4	4	43	3	2	5.41	1.52	5.41
1	1	37	3	2	-4.84	-1.37	4.84
2	2	36	3	2	-5.69	-1.6	5.69
3	3	35	3	2	-5.03	-1.42	5.03
4	4	37	3	2	-0.59	-0.17	0.59
1	1	34	3	2	-7.84	-2.21	7.84
2	2	31	3	2	-10.69	-3.01	10.69
3	3	36	3	2	-4.03	-1.14	4.03
4	4	36	3	2	-1.59	-0.45	1.59
1	1	40	3	2	-1.84	-0.52	1.84
2	2	39	4	2	-2.69	-0.76	2.69
3	3	39	4	2	-1.03	-0.29	1.03
4	4	38	4	2	0.41	0.11	0.41
1	1	41	4	2	-0.84	-0.24	0.84
2	2	41	4	2	-0.69	-0.19	0.69
3	3	40	4	2	-0.03	-0.01	0.03
4	4	34	4	2	-3.59	-1.01	3.59
1	1	36	4	2	-5.84	-1.65	5.84
2	2	34	4	2	-7.69	-2.17	7.69
3	3	33	4	2	-7.03	-1.98	7.03
4	4	32	4	2	-5.59	-1.58	5.59
1	1	37	4	2	-4.84	-1.37	4.84
2	2	33	4	2	-8.69	-2.45	8.69
3	3	31	4	2	-9.03	-2.55	9.03
4	4	32	4	2	-5.59	-1.58	5.59

Anexo 7.

Análisis de varianza de los dilutores GLY y DMF para la motilidad, morfología y viabilidad espermática

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Morf sem des %	128	0.08	0.05	5.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	152.38	4	38.09	2.82	0.0278	
Concnracion %	50.84	3	16.95	1.26	0.2924	
Crioprotector	101.53	1	101.53	7.53	0.0070	-1.78
Error	1659.09	123	13.49			
Total	1811.47	127				

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO Morf sem des %	Normal(0,1)	0.00	13.06	128	0.25	<0.0001

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Morf sem des %	128	0.05	0.02	92.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	40.07	4	10.02	1.69	0.1570	
Concnracion %	39.96	3	13.32	2.24	0.0865	
Crioprotector	0.11	1	0.11	0.02	0.8929	0.06
Error	729.96	123	5.93			
Total	770.02	127				

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Morf sem des %	128	0.08	0.05	5.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	152.38	4	38.09	2.82	0.0278	
Concntracion %	50.84	3	16.95	1.26	0.2924	
Crioprotector	101.53	1	101.53	7.53	0.0070	-1.78
Error	1659.09	123	13.49			
Total	1811.47	127				

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.36278

Error: 13.4886 gl: 123

Concntracion %	Medias	n	E.E.
2	70.72	32	0.65 A
3	70.53	32	0.65 A
1	70.22	32	0.65 A
4	69.09	32	0.65 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viab sem des %	128	0.28	0.26	7.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	500.16	4	125.04	12.23	<0.0001	
Concntracion %	403.90	3	134.63	13.17	<0.0001	
Crioprotector	96.26	1	96.26	9.42	0.0026	-1.73
Error	1257.46	123	10.22			
Total	1757.62	127				

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.05700

Error: 10.2233 gl: 123

Concntracion %	Medias	n	E.E.
2	42.16	32	0.57 A
1	41.75	32	0.57 A
3	40.25	32	0.57 A
4	37.63	32	0.57 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

VIABILIDAD DMF y GLI

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Viab sem des %	128	0.28	0.26	7.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	500.16	4	125.04	12.23	<0.0001	
Concncracion %	403.90	3	134.63	13.17	<0.0001	
Crioprotector	96.26	1	96.26	9.42	0.0026	-1.73
Error	1257.46	123	10.22			
Total	1757.62	127				

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO Viab sem des %	Normal(0,1)	0.00	10.51	128	0.32	<0.0001

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Viab sem des %	128	0.05	0.01	66.24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	18.76	4	4.69	1.48	0.2132	
Concncracion %	2.89	3	0.96	0.30	0.8225	
Crioprotector	15.86	1	15.86	5.00	0.0272	0.70
Error	390.42	123	3.17			
Total	409.17	127				

No se rechaza la Ho, se cumple homogenidad de varianza, no se rechaza la igualdad de varianza

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.38	0.36	7.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	763.03	4	190.76	19.21	<0.0001	
Concncracion %	374.52	3	124.84	12.57	<0.0001	
Crioprotector	388.51	1	388.51	39.13	<0.0001	-3.48
Error	1221.27	123	9.93			
Total	1984.30	127				

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO Moti sem des %	Normal(0,1)	0.00	12.68	128	0.30	<0.0001

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Moti sem des %	128	0.04	0.01	80.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	26.47	4	6.62	1.33	0.2609	
Concnracion %	21.87	3	7.29	1.47	0.2259	
Crioprotector	4.59	1	4.59	0.93	0.3376	0.38
Error	609.81	123	4.96			
Total	636.27	127				

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Moti sem des %	128	0.38	0.36	7.82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	763.03	4	190.76	19.21	<0.0001	
Concnracion %	374.52	3	124.84	12.57	<0.0001	
Crioprotector	388.51	1	388.51	39.13	<0.0001	-3.48
Error	1221.27	123	9.93			
Total	1984.30	127				

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.02719

Error: 9.9291 gl: 123

Concnracion %	Medias	n	E.E.
1	41.84	32	0.56 A
2	41.69	32	0.56 A
3	40.03	32	0.56 A
4	37.59	32	0.56 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Anexo 8.

Comparación de medias y DE de los dilutores DMF y GLY a las 4 concentraciones

Resumen	DMF 1%	DMF2%	DMF3%	DMF4%	DMF1%1	DMF2%1	DMF3%1	DMF4%1	DMF1%2	DMF2%2	DMF3%2	DMF4%2	DMF1%3	DMF2%3	DMF3%3	DMF4%3
Media	46.25	44.75	44.00	39.75	41.75	44.00	44.50	38.25	44.25	45.00	39.25	37.25	43.00	44.50	38.00	37.00
D.E.	1.26	3.30	2.16	2.63	1.26	1.41	1.00	1.71	2.50	2.58	0.96	1.71	0.82	3.11	1.41	2.16
CV	2.72	7.38	4.91	6.62	3.01	3.21	2.25	4.46	5.65	5.74	2.44	4.58	1.90	6.99	3.72	5.84

Medidas resumen

Resumen	1%4	2%4	3%4	4%4	1%5	2%5	3%5	4%5	1%6	2%6	3%6	4%6	1%7	2%7	3%7	4%7
Media	68.75	72.25	69.00	67.75	68.50	71.50	67.00	65.25	75.25	75.50	74.50	73.25	72.00	70.75	73.00	70.50
D.E.	2.63	2.22	3.83	2.63	2.08	1.29	2.94	3.59	2.63	2.65	3.11	3.50	1.41	0.96	1.83	0.58
CV	3.83	3.07	5.55	3.88	3.04	1.81	4.39	5.51	3.49	3.50	4.17	4.78	1.96	1.35	2.50	0.82

Resumen	DMF1%	DMF2%	DMF3%	DMF4%	DMF1%1	DMF2%1	DMF3%1	DMF4%1	DMF1%2	DMF2%2	DMF3%2	DMF4%2	DMF1%3	DMF2%3	DMF3%3	DMF4%3
Media	44.75	44.25	43.00	39.25	41.00	43.50	43.50	38.00	43.50	45.25	39.00	36.00	43.00	44.00	37.00	36.00
D.E.	2.06	2.75	2.16	2.50	1.41	1.73	1.29	1.41	2.08	1.71	1.41	1.63	0.82	2.71	1.83	2.58
CV	4.61	6.22	5.02	6.37	3.45	3.98	2.97	3.72	4.79	3.77	3.63	4.54	1.90	6.15	4.93	7.17

Resumen	GLY1%	GLY2%	GLY3%	GLY4%	GLY1%1	GLY2%1	GLY3%1	GLY4%1	GLY1%2	GLY2%2	GLY3%2	GLY4%2	GLY1%3	GLY2%3	GLY3%3	GLY4%3
Media	44.00	41.25	40.50	37.25	39.25	40.00	41.50	35.00	40.50	42.00	36.25	34.25	39.00	39.00	33.75	33.25
D.E.	0.82	2.75	1.29	2.22	0.96	0.82	0.58	2.16	1.73	2.16	0.96	2.36	0.82	3.37	1.71	2.63
CV	1.86	6.68	3.19	5.95	2.44	2.04	1.39	6.17	4.28	5.14	2.64	6.90	2.09	8.63	5.06	7.91

Resumen	GLY1%	GLY2%	GLY3%	GLY4%	GLY1%1	GLY2%1	GLY3%1	GLY4%1	GLY1%2	GLY2%2	GLY3%2	GLY4%2	GLY1%3	GLY2%3	GLY3%3	GLY4%3
Media	67.50	70.25	67.25	65.00	66.75	71.00	65.75	63.00	72.75	73.75	72.50	72.25	70.50	69.75	71.00	69.00
D.E.	3.11	0.96	4.11	2.94	2.50	0.82	2.75	3.37	2.36	2.75	3.00	1.71	1.29	1.26	0.82	0.82
CV	4.61	1.36	6.12	4.53	3.75	1.15	4.19	5.34	3.25	3.73	4.14	2.36	1.83	1.80	1.15	1.18

Resumen	GLY1%	GLY2%	GLY3%	GLY4%	GLY1%1	GLY2%1	GLY3%1	GLY4%1	GLY1%2	GLY2%2	GLY3%2	GLY4%2	GLY1%3	GLY2%3	GLY3%3	GLY4%3
Media	42.25	42.00	40.00	37.50	39.50	41.75	41.75	35.75	42.25	43.25	38.00	34.25	41.50	43.75	36.25	33.50
D.E.	2.63	2.58	2.58	2.65	1.73	1.50	1.71	1.89	1.71	1.71	0.82	1.50	1.29	2.22	1.71	2.65
CV	6.22	6.15	6.45	7.06	4.38	3.59	4.09	5.30	4.04	3.95	2.15	4.38	3.11	5.07	4.71	7.90

Anexo 9.

Comparación de medias y DE de los dilutores DMF y GLY a las 4 concentraciones para motilidad, morfología y viabilidad

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%	16	43.81	2.23	4.96	0.56	5.08	40.00	48.00	43.50	42.00	45.00	0.23	-0.78
GLY1%	16	40.69	2.30	5.30	0.58	5.66	38.00	45.00	40.00	39.00	42.00	0.59	-0.97
DMF2%	16	44.56	2.45	6.00	0.61	5.49	40.00	48.00	44.50	43.00	46.00	-0.26	-0.99
GLY2%	17	42.24	7.31	53.44	1.77	17.31	34.00	69.00	41.00	40.00	43.00	3.34	9.05
DMF3%	16	41.69	3.18	10.10	0.79	7.62	36.00	46.00	42.00	39.00	45.00	-0.22	-1.33
GLY3%	16	38.00	3.43	11.73	0.86	9.01	32.00	42.00	38.00	35.00	41.00	-0.32	-1.29
DMF4%	16	38.06	2.17	4.73	0.54	5.71	35.00	42.00	38.00	36.00	40.00	0.18	-1.12
GLY4%	16	34.94	2.59	6.73	0.65	7.42	31.00	39.00	34.50	33.00	37.00	-3.1E-04	-1.21

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%1	16	71.56	3.42	11.73	0.86	4.79	65.00	78.00	71.50	69.00	73.00	-0.07	-0.13
GLY1%1	16	69.38	3.28	10.78	0.82	4.73	63.00	76.00	70.00	67.00	71.00	-0.21	-0.05
DMF2%1	16	72.50	2.53	6.40	0.63	3.49	70.00	79.00	72.00	70.00	73.00	1.24	0.73
GLY2%1	16	71.19	2.17	4.70	0.54	3.04	68.00	77.00	71.00	70.00	71.00	1.52	1.80
DMF3%1	16	70.88	4.11	16.92	1.03	5.80	64.00	78.00	71.50	68.00	73.00	-0.30	-0.66
GLY3%1	16	69.13	3.84	14.78	0.96	5.56	62.00	76.00	70.00	66.00	71.00	-0.37	-0.50
DMF4%1	16	69.19	4.00	16.03	1.00	5.79	60.00	77.00	70.00	66.00	71.00	-0.26	0.49
GLY4%1	16	67.31	4.29	18.36	1.07	6.37	58.00	74.00	68.00	65.00	70.00	-0.48	-0.27

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	E.E.	CV	Mín	Máx	Mediana	Q1	Q3	Asimetría	Kurtosis
DMF1%2	16	43.06	2.05	4.20	0.51	4.76	39.00	47.00	43.00	42.00	44.00	0.12	-0.34
GLY1%2	16	41.38	2.06	4.25	0.52	4.98	37.00	45.00	41.00	40.00	43.00	-0.06	-0.36
DMF2%2	16	44.25	2.14	4.60	0.54	4.85	40.00	47.00	45.00	43.00	46.00	-0.51	-0.90
GLY2%2	16	42.69	2.02	4.10	0.51	4.74	39.00	46.00	43.00	41.00	44.00	-0.12	-0.97
DMF3%2	16	40.63	3.20	10.25	0.80	7.88	35.00	45.00	40.50	38.00	43.00	-0.15	-1.19
GLY3%2	16	39.00	2.68	7.20	0.67	6.88	34.00	44.00	38.50	37.00	41.00	0.21	-0.60
DMF4%2	16	37.31	2.36	5.56	0.59	6.32	33.00	42.00	37.50	36.00	39.00	0.02	-0.53
GLY4%2	16	35.25	2.54	6.47	0.64	7.21	30.00	40.00	35.50	33.00	37.00	-0.07	-0.28