

*Artículo original:*

## **CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE CABALLO PERUANO DE PASO UTILIZANDO DIMETILACETAMIDA COMO AGENTE CRIOPROTECTOR** **Cryopreservation of Peruvian Paso horse breed sperm using dimethylacetamide as cryoprotectant agent**

**Gallo S., Vargas S., Orozco V., Evangelista  
S., Santiani A.**

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.*

Email: samantha.gallo.miranda@gmail.com

*Palabras Clave:*

*Equino, criopreservación, semen, dimetilacetamida*

### **INTRODUCCIÓN**

La raza Caballo Peruano de Paso es una raza declarada “producto bandera” del Perú, creando pasión en los criadores y de esa manera se ha abierto camino a la reciente aceptación por los mismos de las técnicas de criopreservación seminal. Entre los distintos crioprotectores que para dicha técnica se utilizan, se cree que la dimetilacetamida (DMA) tiene los mejores resultados para la mayoría de equinos, con respecto al resto de crioprotectores permeables (Medeiros *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2005), los cuales se caracterizan por penetrar al citoplasma del espermatozoide reemplazando el agua intracelular y evitando así la formación de cristales de hielo que pudieran dañar la integridad de la célula espermática. El presente estudio tiene como objetivo determinar cuál de las 3 concentraciones (3, 4 y 5%) de DMA protege mejor al espermatozoide durante la curva de enfriamiento (refrigeración a 5 °C) y durante la criopreservación de semen de Caballo Peruano de Paso.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se realizó entre Octubre del 2012 y Febrero del 2013, en el Departamento de Lima, provincia de Lima, Distrito de Villa el Salvador, en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Científica el Sur. Se utilizaron potros (3) de criaderos ubicados en Mala, Lurín y Villa.

Para las muestras se utilizaron 3 potros de raza Caballo Peruano de Paso, saludables, de buena libido. Los potros tuvieron entre 3 y 7 años y fueron entrenados para la colección seminal utilizando una vagina artificial tipo Missouri. En total se obtuvieron 14 eyaculados, los cuales fueron filtrados y diluidos en un medio Kenney Base. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos para retirar el plasma seminal. Posteriormente, los pellets fueron resuspendidos en un dilutor Kenney para congelamiento (12.5ml de Dilutor Kenney Base, 25ml de leche descremada y 10ml de yema de huevo pardo) y se formaron 3 alícuotas de 1500ul cada una. Con estas alícuotas se formaron 3 grupos experimentales: (1) DMA al 3%, (2) DMA al 4% y (3) DMA al 5%. En cada grupo se agregó la DMA a la alícuota para obtener las concentraciones finales del agente crioprotector establecidas. Se preparó un pajilla de 0.5 ml por cada grupo. Para el proceso de criopreservación se utilizó un equipo programable y se configuró con la curva de enfriamiento para semen equino de tal manera que en 60 minutos llegara desde 20 °C hasta -20°C, posterior a esto se procedió a sumergir las pajillas en el nitrógeno líquido donde llegarían hasta -196°C. Para la descongelación, las pajillas fueron extraídas del tanque de nitrógeno y sumergidas en agua tibia a 37°C por 1 minuto. Los parámetros evaluados fueron motilidad progresiva; viabilidad e integridad acrosomal, evaluada a través de la técnica de doble tinción con azul

tipan y giemsa descrito por Didion *et al.* (1989); y la integridad funcional de membrana, evaluada a través del test hiposmótico descrito por Correa *et al.* (1997) usando la temperatura de incubación de 37°C por 10 minutos. Estos parámetros fueron evaluados en tres momentos: al inicio del experimento (37°C), luego de la curva de enfriamiento (5°C) y luego del proceso de criopreservación (-196°C). Los porcentajes de variables que se analizaron (motilidad progresiva, integridad acrosomal e integridad funcional de membrana) se transformaron a valores angulares ( $\text{ángulo} = \arccos(x)$ ) para acercar los datos a la distribución normal, y posterior a ello se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey para la comparación de las concentraciones, con un nivel de significancia fijado a 0.05.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Tabla 1, se observa que al finalizar la curva de enfriamiento, la motilidad espermática en el grupo DMA 3% es superior ( $p < 0.05$ ) al grupo DMA 4%. Por otro lado, luego del proceso de criopreservación, no encontramos diferencias entre ninguno de los grupos en las 3 variables evaluadas.



Tabla 1. Porcentajes de motilidad progresiva, integridad de membrana e integridad acrosomal en semen refrigerado de Caballo Peruano de Paso usando la dimetilacetamida como crioprotector en tres concentraciones diferentes (3%, 4% y 5%)

	Semen Fresco	Dimetilacetamida		
		3%	4%	5%
Motilidad Progresiva (%)	66.7 ± 24.34	68.6 ± 16.2 <sup>a</sup>	61.8 ± 24.0 <sup>ab</sup>	45.7 ± 27.8 <sup>b</sup>
Integridad de Membrana (%)	41.1 ± 12.77	33.8 ± 12.3 <sup>a</sup>	35.6 ± 9.1 <sup>a</sup>	34.6 ± 8.5 <sup>a</sup>
Integridad de Acrosoma (%)	74.6 ± 12.93	55.1 ± 18.8 <sup>a</sup>	52.3 ± 16.3 <sup>a</sup>	48.6 ± 17.0 <sup>a</sup>

Las letras a y b simbolizan diferencias significativas en las filas.  
Análisis no incluye datos de semen fresco

Tabla 2. Porcentajes de motilidad progresiva, integridad de membrana e integridad acrosomal en semen descongelado de Caballo Peruano de Paso usando la dimetilacetamida como crioprotector en tres concentraciones diferentes (3%, 4% y 5%)

	Semen Fresco	Dimetilacetamida		
		3%	4%	5%
Motilidad Progresiva (%)	66.7 ± 24.34	51.4 ± 21.8 <sup>a</sup>	57.1 ± 26.7 <sup>a</sup>	57.2 ± 25.2 <sup>a</sup>
Integridad de Membrana (%)	41.1 ± 12.77	35.5 ± 10.0 <sup>a</sup>	37.8 ± 12.3 <sup>a</sup>	35.0 ± 10.2 <sup>a</sup>
Integridad de Acrosoma (%)	74.6 ± 12.93	26.1 ± 12.4 <sup>a</sup>	25.1 ± 16.4 <sup>a</sup>	26.5 ± 12.6 <sup>a</sup>

La letra a simboliza que no hubo diferencias significativas en las filas.  
Análisis no incluye datos de semen fresco

En diversos estudios que incluyen a la DMA, se suele trabajar en concentraciones de 4% (Alvarenga *et al.*, 2004, Alvarenga *et al.*, 2005, Squires *et al.*, 2004). En nuestro trabajo, decidimos aumentar y disminuir ligeramente la concentración final de DMA para explorar si algún cambio en su concentración brindaba mejores características seminales luego del proceso de criopreservación, sin embargo, los resultados se mantuvieron invariables al comparar las 3 concentraciones en estudio. Se ha observado en estudios preliminares que venimos realizando que la DMA al 4%, comparada con otros crioprotectores para la criopreservación de semen de Caballo Peruano de Paso, es la que tiene mejores resultados. Esto podría ser explicado porque la DMA es un crioprotector de bajo peso molecular, por lo cual su penetración al interior de la célula espermática es más efectiva en términos que lo hace con mayor rapidez, de manera que expone a la célula a menos tiempo de daño por toxicidad, un efecto colateral que todos los crioprotectores poseen, pero en menor proporción. Además, al penetrar la célula en la velocidad adecuada y por tener el peso molecular bajo, previene la formación de cristales intracelulares y también la deshidratación de la célula, de manera que la protege de daños contra la membrana (Kim *et al.*, 2011; Iaffaldano *et al.*, 2012; Alvarenga *et al.*, 2005)

## CONCLUSIONES

En conclusión, las concentraciones finales de 3, 4 y 5% de dimetilacetamida utilizadas como agentes crioprotectores para la criopreservación del semen equino de la raza Caballo Peruano de Paso, tienen similares porcentajes de motilidad, vitalidad e integridad funcional de membrana.

## BIBLIOGRAFIA

- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. *Anim Reprod Sci* 89:105–113.
- Alvarenga MA, Leão KM, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL, Gomes GM. 2003. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 12 Suppl 8:74–76.
- Orozco V, Rosemberg M, Santiani A, Rodríguez H. 2011. *Científica* 8(2):104–114.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. *Theriogenology* 62:1056–1065.
- Laffaldano N, Di Lorio M, PinaRosato M. 2012. *Theriogenology* 78:1381-1389.

