

**EVALUACIÓN DE VIABILIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL Y ACTIVIDAD
MITOCONDRIAL EN SEMEN REFRIGERADO DE CABALLO PERUANO DE PASO.
REPORTE PRELIMINAR**

Evaluation of the viability, acrosomal integrity and mitochondrial activity in chilled
semen of Peruvian Paso Horse. Preliminary report

H. Dellepiane¹, S. Chilge¹, D. Vexelman¹, A. Ugarelli¹, S. Evangelista¹, A. Santiani^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.8>

¹ *Facultad de Ciencias
Veterinarias y Biológicas,
Universidad Científica del
Sur, Lima, Perú.*

² *Laboratorio de Reproducción
Animal, Facultad de
Medicina Veterinaria,
Universidad Nacional Mayor
de San Marcos.*

E-mail:
helen_lfmh@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la refrigeración sobre la viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen de Caballo Peruano de Paso (CPP). Dos muestras de semen de CPP fueron colectadas, filtradas y centrifugadas para eliminar el plasma seminal. Luego fueron diluidas en leche UHT-glucosa y mantenidas a 5°C por 48 horas. Las evaluaciones se hicieron a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración. Se evaluó la viabilidad e integridad acrosomal utilizando la lectina de *Pissum sativum* y yoduro de propidio (FITC-PSA/PI) y la actividad mitocondrial utilizando Mitotracker Red CMXROs®. Las lecturas se realizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto disminuyó gradualmente durante las 0, 24 y 48 de refrigeración (55%, 42% y 31%, respectivamente), mientras que la actividad mitocondrial disminuyó bruscamente a las 24 horas (De 67 a 34%) y se mantuvo similar a las 48 horas (29%). Se concluye que durante la refrigeración de semen de CPP, la calidad seminal disminuye progresivamente, sin embargo es necesario realizar un mayor número de repeticiones.

Palabras clave: *Caballo Peruano de Paso, refrigeración de semen, viabilidad e integridad acrosomal, actividad mitocondrial.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of cooling at 5°C on the viability and acrosomal integrity and mitochondrial activity in the Peruvian Paso Horse (CPP). Two semen samples were collected, filtered and centrifuged to remove the seminal plasma. Then, they were diluted on an extender based on milk-glucose and

maintained at 5 °C for 48 hours. Evaluations were made at 0, 24 and 48 hours after cooling. Acrosomal integrity and viability was assessed using *Pissum sativum* lectin and propidium iodide (FITC-PSA / PI) and the mitochondrial activity using Mitotracker Red CMXROs®. Analysis were performed by flow cytometry. The percentage of viable spermatozoa with intact acrosomes decreased gradually during 0, 24 and 48 of

refrigeration (55%, 42% and 31% respectively), while the mitochondrial activity decreased sharply at 24 hours (from 67 to 34%) and it remained similar after 48 hours (29%). We conclude that during cooling, the semen quality decreases progressively, however it is necessary to confirm our result with more a greater number of repetitions.

Keywords: *Peruvian Paso Horse, cooling sperm, viability and acrosomal integrity, mitochondrial activity.*

INTRODUCCION.

El Caballo Peruano de Paso (CPP) es una raza declarada producto bandera del Perú, de gran importancia económica y cultural en nuestro país. La fertilidad en yeguas inseminadas con semen almacenado y refrigerado es variable entre sementales y laboratorios (Pickett, 1995; Katila, 1997), dependiendo de muchos factores como la temperatura de almacenamiento, la composición del dilutor, número de espermatozoides inseminados, número de inseminaciones, etc (Battelier et al., 2001). El almacenamiento de semen equino, ya sea en 20 ó 5 °C durante 24 h no tienen ningún efecto aparente sobre la capacidad fecundante; sin embargo, la reducción de la motilidad es más dramática en el semen almacenadas a 20 °C que en la que se almacena a 5 °C (Varner et al., 1989). Sin embargo, Pickett (1995) reportó que la fertilidad disminuye cuando el semen se almacenó por más de 48 horas a 5 °C. No obstante, se ha reportado que es posible conseguir 65% de fertilidad utilizando semen refrigerado a 4 °C por 48 horas (Heiskanen et al., 1994). En CPP, existen pocos reportes sobre conservación del semen, habiéndose descrito que durante el proceso de refrigeración a 5°C, la motilidad e integridad funcional de membrana disminuyen significativamente a las 48 horas (Orozco et al., 2013). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la refrigeración sobre la viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen de CPP.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad Ecuestre de la Universidad Científica del Sur, Villa el Salvador, Lima. Se colectaron dos muestras de semen de Caballo Peruano de Paso, de 4 años y medio con antecedentes de fertilidad, con la ayuda de una vagina artificial tipo Missouri. Una vez obtenida las muestras se filtraron para la eliminación del gel espermático. Luego, la muestra fue diluida en un dilutor en base a leche descremada UHT (100 mL) y glucosa (2,45 g.) y

se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos para retirar el plasma seminal. El pellet fue resuspendido en el mismo dilutor y transportado en un Equitainer a 5°C hacia el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

Se evaluaron los porcentajes de viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial de las muestras a las 0, 24 y 48 horas post refrigeración a 5° C. Para evaluar la integridad acrosomal y viabilidad se utilizaron FITC-PSA (Concentración final de 2.5 µg/ml) y yoduro de propidio (Concentración final de 5 µg/ml) respectivamente, en donde los espermatozoides con daño acrosomal muestran fluorescencia verde en la región acrosomal y los espermatozoides muertos muestran fluorescencia roja/naranja en el núcleo espermático. Para la evaluación de la actividad mitocondrial se utilizó Mitotracker Red CXMRos, en donde los espermatozoides con alta actividad mitocondrial emiten fluorescencia naranja en la pieza media del espermatozoide. Estas fluorescencias pueden observarse en la Figura 1.

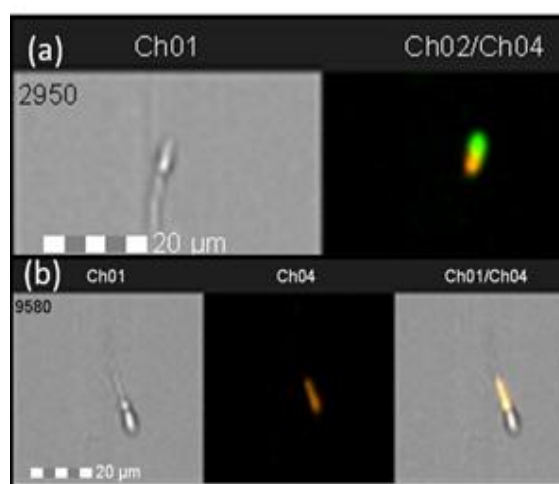


Figura 1. Espermatozoides de equino incubados con (a) FITC-PSA/PI, se observa fluorescencia verde en región acrosomal indicando daño acrosomal y fluorescencia naranja en el núcleo espermático, indicando muerte celular; y (b) Mitotracker Red CXMRos en donde se observa la fluorescencia naranja en la pieza media del espermatozoide, indicando alta actividad mitocondrial.

Ambos parámetros fueron evaluados mediante citometría de flujo utilizando un equipo FlowSight (Amnis, Estados Unidos) que tiene un sistema analizador de imágenes. Se evaluaron un total de 10'000 espermatozoides para cada parámetro. En el caso de viabilidad e integridad acrosomal se utilizó el

láser de excitación de 488 nm con una potencia de 20 mW, y la fluorescencia emitida fue detectada utilizando los canales de detección Ch02 (Para FITC-PSA) y Ch04 (Para Ioduro de propidio). En el caso del análisis del Mitotracker Red CMXRos se utilizó el láser de 488 nm con una potencia de 60 mW y la fluorescencia emitida fue detectada utilizando el canal de detección Ch04. Los resultados se presentan a través de gráficos dop plot y porcentajes de espermatozoides viables con acrosoma intacto y porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial, los cuales están presentados de manera descriptiva en tablas con los promedios correspondientes con su desviación estándar.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa que el porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto va descendiendo conforme las horas de refrigeración van aumentando. Así, las muestras empezaron con un 55.5 ± 4.88 de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, y finalizaron con $31.6 \pm 3.54\%$. Sin embargo, si analizamos la Figura 2, podemos observar que el daño acrosomal es mínimo y que este parámetro disminuye principalmente por un aumento de la proporción de espermatozoides muertos.

Tabla 1. Efecto de la refrigeración durante 0 horas, 24 horas y 48 horas en los porcentajes de viabilidad e integridad acrosomal y alta actividad mitocondrial en semen equino de Caballo Peruano de Paso

Parámetros evaluados	0 horas	24 horas	48 horas
% esperm. viables con acrosoma intacto.	55.5 ± 4.8	42.2 ± 1.84	31.6 ± 3.5
% esperm. con alta actividad mitocondrial	67.6 ± 1.2	34.5 ± 7.4	29.0 ± 6.2

Valores son promedios \pm desvío estándar

Con respecto a la actividad mitocondrial, en el Cuadro 1 encontramos que la principal caída en el porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial ocurre dentro de las primeras 24 horas de refrigeración. En ese sentido, en la Figura 3, se destaca que la población de espermatozoides con alta actividad mitocondrial a las 0 horas es mayor, porque observamos la mayor cantidad de eventos localizados en el cuadrante superior, sin embargo, a las 24 y 48 horas observamos que la mayoría de eventos se encuentran en la población inferior (Baja actividad mitocondrial).

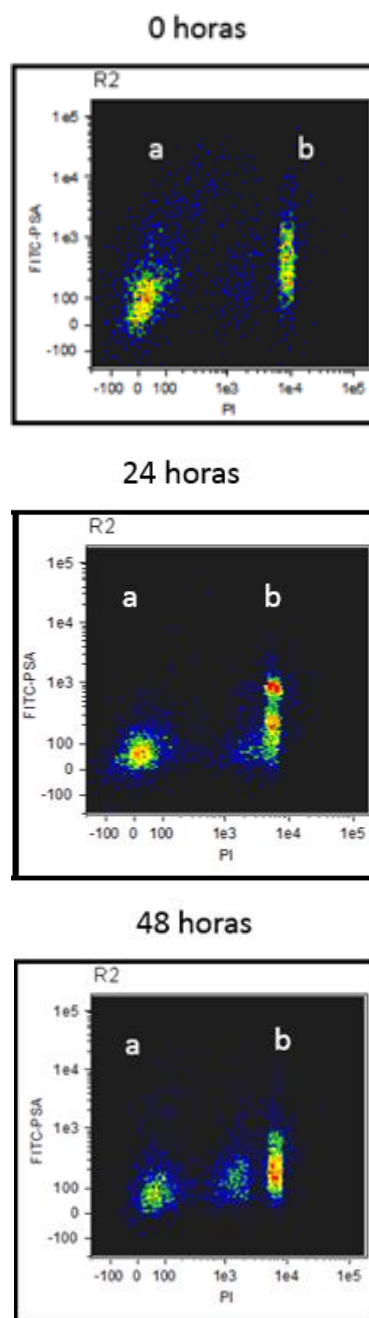


Figura 2. Viabilidad e integridad acrosomal evaluadas con FITC-PSA y PI a las 0, 24 y 48 de la refrigeración de semen de Caballo Peruano de Paso.

DISCUSIÓN

En nuestro reporte encontramos que la viabilidad e integridad acrosomal disminuyen progresivamente durante las 48 del estudio, mientras que la actividad mitocondrial tiene una reducción importante en las primeras 24 horas. Estos resultados estarían relacionados a los reportado en CPP por Orozco et al (2013), quien reporto una disminución significativa de la motilidad e integridad funcional de membrana a las

48 horas de la refrigeración a 5°C. En otra raza equina se ha reportado una tasa de fertilidad del 65% utilizando semen refrigerado y almacenado por 3 días a 4°C (Heiskanen et al., 1994), por lo cual se deberían realizar más investigaciones con el uso del semen de CPP refrigerado a 5°C para determinar el porcentaje de fertilidad. Asimismo es necesario realizar un mayor número de repeticiones en nuestro estudio para poder realizar un adecuado análisis estadístico.

durante la refrigeración de semen de CPP. Estos resultados nos servirán para evaluar la actividad mitocondrial en intervalos más cortos durante las primeras 24 horas de refrigeración.

REFERENCIAS

- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advance in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 2001; 68, 181–190.
- Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Mäenpää PH. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 or 80 h. *Theriogenology* 1994; 42, 1043–1051.
- Katila T. Procedures for handling fresh stallion sperm. *Theriogenology* 1997; 48, 1217–1227.
- Orozco V, Rosemeberg M, Santiani A, Rodriguez H. Evaluación de tres dilutores para la refrigeración de semen de Caballo Peruano de Paso y sus efectos sobre la motilidad espermática e integridad funcional de la membrana. Perú. 2011. *Spermova*. 2013; 3(1): 71 – 72.
- Pickett B. Retrospective and review. *Biol. Reprod. Monogr.* 1995; 1, 547–564.
- Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, Meyers SA. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 h at 5 or 20 °C. *Theriogenology* 1989; 32, 515–525.

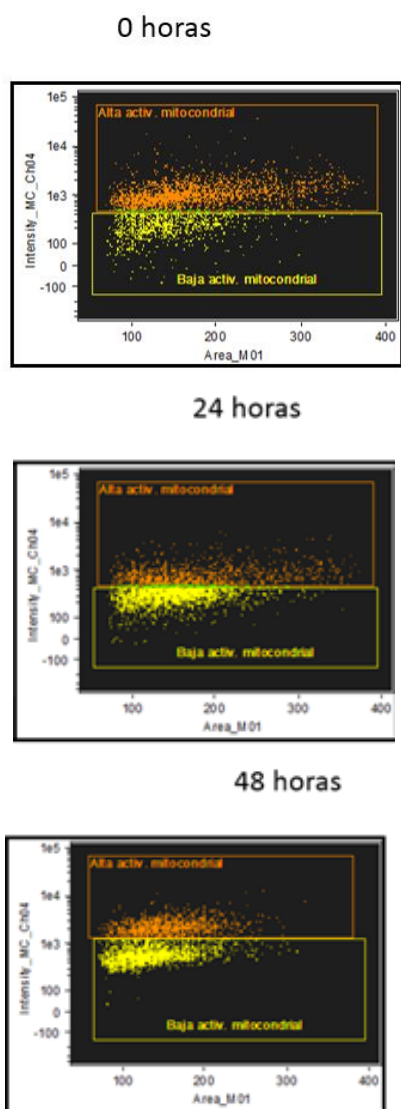


Figura 3. Actividad mitocondrial evaluada con Mitotracker Red CMXRos a las 0 horas, 24 horas y 48 horas en semen equino de Caballo Peruano de Paso. Alta actividad mitocondrial en color naranja. Baja actividad mitocondrial en color amarillo.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio nos permiten conocer la viabilidad espermática e integridad acrosomal así como de la actividad mitocondrial