

*Artículo original:*

## **CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE CABALLO PERUANO DE PASO UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE AGENTES CRIOPROTECTORES**

### **Cryopreservation of Peruvian Paso horse sperm using different kinds of cryoprotective agents**

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

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

Email: s\_vargas\_mendivil@hotmail.com

*Palabras Clave:*

*Equino, semen, criopreservación, evaluación*

#### **INTRODUCCIÓN**

En el Caballo Peruano de Paso no se ha estudiado el efecto de diferentes agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de semen. Existen evidencias indicando, que los espermatozoides de diferentes razas equinas (Chenier *et al.*, 1998; Squires *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2011) tienen distinta susceptibilidad a cada agente crioprotector. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar que agente crioprotector conserva mejor los parámetros seminales post-descongelamiento

---

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó entre Agosto del 2012 y Febrero del 2013, en la Universidad Científica del Sur, Villa El Salvador (Lima). Se utilizaron 3 sementales provenientes de criaderos ubicados en los Distritos: de Mala, Lurín y Villa el Salvador. Los sementales utilizados en el estudio fueron de la raza Caballo Peruano de Paso, con edades entre 3 y 7 años, colectados semanalmente mediante el método vagina artificial, modelo Missouri. En total se obtuvieron 14 eyaculados, a los cuales se eliminó la fracción gel. A continuación se diluyó con Kenney base, siendo centrifugadas a 600 g por 10 minutos para eliminar el plasma seminal. Posteriormente, los pellets fueron resuspendidos en diluyente Kenney freezing y se dividieron en 4 alícuotas de 1440 ul cada una, formando los grupos experimentales y agregando 60 ul de cada agente crioprotector (glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y dimetilacetamida) para llegar a la concentración final deseada (4%). Las variables evaluadas fueron motilidad progresiva, integridad funcional de membrana y viabilidad e integridad acrosomal. Para la motilidad progresiva, se basó en el conteo de los espermatozoides que poseían movimiento rectilíneo hacia adelante, para evaluar la integridad funcional de membrana se basó en el test hiposmótico (HOS) descrita por Melo *et al.* (2005). Asimismo para viabilidad e integridad acrosomal se basó en la técnica de doble tinción (DT) descrita por Didion *et al.* (1989), utilizando azul tripan (2%) y giemsa (10%). Estas variables fueron evaluadas en el semen fresco 37°C y después del proceso de criopreservación. Los resultados de las variables se expresaron en porcentajes, los cuales se

transformaron a valores angulares ( $\text{ángulo} = \arccos(\sqrt{x})$ ) para acercar los datos a la distribución normal. Posteriormente con los datos obtenidos, se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor. Al encontrarse diferencias significativas se realizó el test de Tukey.

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados se pueden observar en la Tabla 1 y muestran el efecto de los agentes crioprotectores en las variables (motilidad progresiva, integridad funcional de membrana y viabilidad e integridad acrosomal) luego del proceso de criopreservación de semen de Caballo Peruano de Paso. Se encontraron diferencias significativas entre crioprotectores en la motilidad progresiva y viabilidad e integridad acrosomal.

La dimetilacetamida tuvo un mejor ( $p < 0.05$ ) desempeño en la motilidad progresiva ( $>50\%$ ) frente a los demás agentes crioprotectores ( $< 20\%$ ). De igual manera, la viabilidad e integridad acrosomal fue superior ( $p < 0.05$ ) en el grupo dimetilacetamida (25%) y etilenglicol (21.9%) frente a dimetilsulfóxido (10.1%). Finalmente en cuanto a la integridad funcional de membrana no hubo diferencias entre grupos. Estos resultados demostrarían que para espermatozoides de Caballo Peruano de Paso, la dimetilacetamida es el crioprotector que mejor protege al espermatozoide equino entre los agentes crioprotectores ensayados en el presente trabajo. El bajo peso molecular y menor viscosidad de este agente crioprotector, estaría facilitando un ingreso más eficiente a través de la membrana espermática, reduciendo los cambios a nivel citoplasmático y el estrés osmótico al que se somete el espermatozoide.

Estudios en otras razas equinas, indicarían que las amidas tienen la misma capacidad de proteger que el glicerol (Squires *et al.* 2004) en razas de exhibición y cabalgata (light horses). Sin embargo, Chenier *et al.* (1998) han demostrado que los sementales de otras razas equinas que no responden bien con glicerol, mejoran sus parámetros seminales post-



descongelamiento con dimetilsulfóxido. Incluso, Hoffman *et al.* (2011) mostraron que en la raza Lower Saxonian, a concentraciones de 4%, tanto glicerol como etilenglicol son mejores que las amidas. Estos resultados confirmarían la variabilidad entre razas equinas para tolerar mejor un determinado agente crioprotector.

Tabla 1. Parámetros espermáticos obtenidos luego del congelamiento/descongelamiento utilizando diversos agentes crioprotectores en espermatozoides criopreservados de Caballo Peruano de Paso

Parámetro evaluado (%)	fresco	Agentes crioprotectores			
		GMSO	GMA	GMSO	GMA
Integridad funcional de membrana	71.08 ± 18.92	16.86 ± 17.25 <sup>a</sup>	12.93 ± 14.94 <sup>a</sup>	11.6 ± 17.56 <sup>a</sup>	57.14 ± 26.70 <sup>b</sup>
Viabilidad e integridad acrosomal	41.1 ± 12.77	40.8 ± 14.15	36.3 ± 10.56	34.4 ± 13.04	37.8 ± 12.25
Viabilidad e integridad acrosomal	74.6 ± 12.93	19.79 ± 9.87 <sup>ab</sup>	21.93 ± 9.72 <sup>b</sup>	10.14 ± 7.57 <sup>a</sup>	25.07 ± 16.41 <sup>b</sup>

Valores son medias ± desviaciones estándar.

Letras con superíndice diferente en filas (a, b), indica diferencias significativas (P < 0.05).

## CONCLUSIONES

En conclusión, la criopreservación de semen equino en la raza Caballo Peruano de Paso se realiza satisfactoriamente utilizando el agente crioprotector dimetilacetamida al 4%, demostrando que las amidas tienen mejor afinidad y respuesta en comparación con otros agentes crioprotectores en esta raza.

## BIBLIOGRAFIA

- Chenier T, Merckies K, Leibo S, Plante C, Johnson W. 1998. *AAEP PROCEEDINGS* 44.
- Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. 2011. *Anim Reprod Sci* 125:112-118.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. *Theriogenology* 62: 1056-1065.
- Didion B, Dobrinsky J, Giles J, Graves C. 1989. *Gamete Res* 22:51-57.
- Melo MIV, Henry M, Beker ARCL. 2005. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57:757-763.



Figura 1: Colección de semen en Potro



Figura 2: Espermatoxoides con reactivos doble tinción.

