

Artículo original:

PRUEBA DE TERMORRESISTENCIA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE EQUINO CONGELADO CON DOS CRIOPROTECTORES

Thermoresistance test for epididymal stallion sperm frozen with two cryoprotectants

Olmos R., Ancco E., Celiz H., Quispe C., Mellisho E. **INTRODUCCIÓN**

*Laboratorio de Biotecnología Reproductiva,
Departamento Producción Animal, Facultad de
Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La
Molina.*

Email: rodobelolmos1@gmail.com

Palabras Clave:

Equini, espermatozoide, criopreservación, DMF

La biotecnología reproductiva comprende una serie de técnicas que permiten incrementar la tasa reproductiva del macho y/o hembra, reproducir animales con problemas reproductivos, conservar las especies en peligro de extinción, etc. En equinos, la inseminación artificial, es la técnica que se aplicó masivamente a inicios de los años 1900, sin embargo, en la actualidad es una crianza de lujo o elite. En el Perú, el Caballo Peruano de Paso, se ha convertido en el sello de producto de bandera, por lo que es muy importante trabajar en la difusión del material genético de nuestra raza equina. Gibb *et al.* (2013); Oliveira y Mondino (2007) resaltan la importancia de la criopreservación espermática, evaluar la termorresistencia, además de utilizar la dimetilformamida y glicerol como agentes crioprotectores, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la termorresistencia de espermatozoides epididimarios de equino congelado con dos crioprotectores (Dimetilformamida y Glicerol).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, Facultad de Zootecnia, UNA La Molina. Los testículos (epidídimos) (n=16) de potros adultos y en buen estado sanitario fueron obtenidos del Camal de Equinos "CASA BLANCA"- Pachacamac, a 30 km del laboratorio y fueron transportados en condiciones isotérmicas a 37 °C. La recuperación de los espermatozoides se realizó mediante la técnica de lavado retrógrado del epidídimo descrita por Muradás (2006) y Monteiro *et al.* (2009), luego se realizó el proceso de incubación con medio Lactato Ringer (Solución Hartman) por 30 minutos, se centrifugó a 2000 RPM por 15 minutos, para resuspender se utilizó dilutor a base de sacarosa (7%) y yema de huevo (3%) con los siguientes niveles de crioprotectores, dimetilformamida-DMF (4%), glicerol-GLI(4%) y una combinación de dimetilformamida-DMF (2%) + glicerol-GLI (2%) llevándose a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 5°C para finalizar el proceso de congelación a 15 minutos en vapores de nitrógeno líquido. La dilución final fue 80 millones de espermatozoides móviles que fueron colocadas en pajillas de 0,5 ml criopreservadas y almacenadas en tanques de nitrógeno líquido (-196 °C). La descongelación de espermatozoides se realizó a 75°C por 7 segundos, inmediatamente se realizó la evaluación de la motilidad espermática en cuatro tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos (test de termorresistencia). La evaluación de los datos (ANOVA) se realizó con el programa SAS 9.12. Para la prueba de medias se realizó el test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación nos muestra el efecto de los tratamientos (crioprotectores) sobre la motilidad post colecta del epidídimo, en la cual se puede observar motilidades inferiores a 14%, sin embargo luego de la resuspensión la motilidad fue 75.0, 40.0 y 68,4% previo a la congelación con dimetilformamida (4%), glicerol (4%) y mixto de dimetilformamida (2%) + glicerol (2%) respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados por Guedes *et al.* (2013).



Figura 1: Testículos recuperados de matadero



Tabla 1. Motilidad post descongelamiento de espermatozoides epididimarios en equino (Test de Termorresistencia espermática).

Tratamiento	n	0 min	30 min	60 min	90 min
Glicerol	16	22.6 ± 5.9 b	14.5 ± 4.3 b	8.6 ± 3.9 b	3.4 ± 2.9 b
DMF2% + Glicerol	16	42.1 ± 10.0 a	31.6 ± 11.9 a	18.9 ± 10.8 a	8.6 ± 8.7 b
DMF4%	16	46.1 ± 12.6 a	35.9 ± 12.3 a	22.1 ± 9.8 a	14.0 ± 9.6 a

Valores son medias ± desviaciones estándar.

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

En la evaluación de la prueba de termorresistencia que se muestran en la tabla 1, se observa un mejor desempeño de la dimetilformamida (4%) comparado con el tratamiento glicerol (4%) (p < 0.05) sobre la motilidad a diferentes tiempos de incubación en baño maría a 37 °C (0 min, 30 min, 60 min y 90 min), además podemos mencionar que si bien la persistencia de la motilidad es mejor a través del tiempo, ésta se reduce paulatinamente de 46.1% hasta 14.0%, resultados que contrastan con lo observado por Gibb *et al.* (2013) quienes reportan una motilidad post descongelación a 45 minutos que desciende hasta 5%.

Estos resultados nos indican que la DMF es un agente crioprotector de mejor desempeño para la criopreservación de los espermatozoides equinos, además desde el punto de vista celular su bajo peso molecular (73,1 g/mol) hace que sea más fácil su penetración al interior del espermatozoide sin causar mayor daño en el citoplasma. Estudios en equinos utilizando DMF demuestran que las características del semen post descongelamiento fueron mejorados con este agente crioprotector (Gibb *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

La dimetilformamida es el crioprotector que, en la congelación de espermatozoides equinos, tuvo las mejores tasas de motilidad de descongelamiento y termorresistencia obtenidos de epidídimo en equinos.

BIBLIOGRAFIA

- Muradás PR, Weiss PR, Kozick LE, Granemann LC, Santo IW, Pimpão CT. 2006. *Arch Vet Sci* 1:69-74.
- Monteiro GA, Gausti PN, Papa FO. 2009. *Vet. E Zootec* 16(3):448-458.
- Guedes D, Vianna A, Monteiro GA, Emerim A, De Moura CF. 2013. *Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina*. 212-215 pp.
- Gibb Z, Morris L, Maxwell W, Grupen C. 2013. *Theriogenology* 79:1027-1033.
- Oliveira R, Mondino C. 2007. Universidad Federal de Santa María, *Tesis de Maestría, Brasil*.

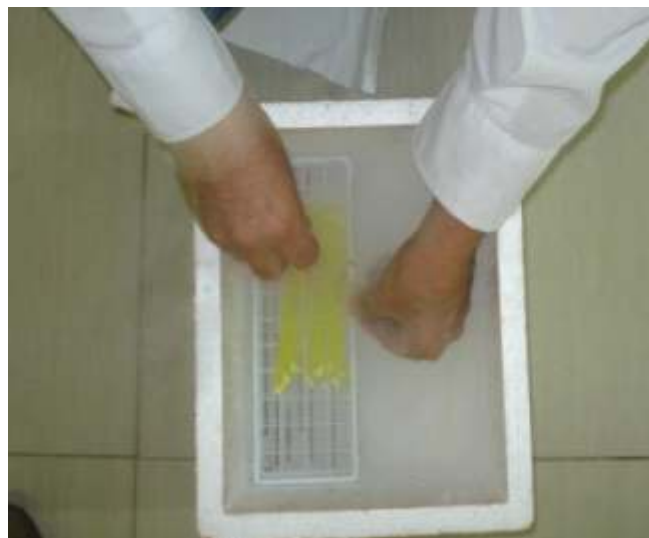


Figura 2: Caja de congelación de semen en pajillas.

