

Efecto de la asociación L-glutamina – Etilenglicol en la Criopreservación de semen equino

Jorge Alberto Neira* / Germán Francisco Ramírez**
Sergio Andrés León García*** / Diego Andrés Moreno García***

RESUMEN

Con el objeto de mejorar la eficiencia en la criopreservación de semen equino, se evaluó el efecto de la asociación L-glutamina con el Etilenglicol y Glicerol en el medio de congelación seminal. Se usaron 4 reproductores criollos colombianos para completar un total de 21 muestras que fueron congeladas en diferentes medios de congelación constituidos de medio INRA 97 y crioprotectante según estudio: L-glutamine 80mM + Etilenglicol 2,5% (protocolo 1), L-glutamine 80 mM + Glycerol 2,5% (protocolo 2), Etilenglicol 2,5% (protocolo 3) y glycerol 2,5% (protocolo 4). La metodología de congelación fue: 60 minutos para descender la temperatura de 38° C a 5° C (0,55° C/min) durante el transporte. Se centrifugaron las muestras a 600C/10min, se diluyó el semen con los 4 protocolos en pajillas de 0,5 ml. Luego 60 minutos de equilibrio en refrigeración; 20 minutos en vapores de nitrógeno líquido y posterior inmersión. En la evaluación de la motilidad progresiva no se encontró diferencia significativa entre protocolos al

tiempo 0 ($p \leq 0.6383$), al tiempo 30 min ($p \leq 0.511$) y al tiempo 60 min ($p \leq 0.1659$). Las medias de motilidad para los 4 protocolos al tiempo 0 fueron (1) $29,6 \pm 15,1$; (2) $28,1 \pm 13,5$; (3) $28,4 \pm 12,3$ y (4) $30,8 \pm 11,1$; a los 30 minutos: (1) $25,1 \pm 13,6$; (2) $22,3 \pm 13,0$; (3) $24,9 \pm 12,4$ y (4) $25,5 \pm 11,6$ y a los 60 minutos (1) $17,1 \pm 10,2$; (2) $15,4 \pm 11,7$; (3) $19,9 \pm 11,5$ y (4) $17,6 \pm 10,4$. La sobrevivencia espermática fue evaluada con coloración eosina-nigrosina, post-descongelación y no se encontró diferencia significativa entre los protocolos ($p \leq 0.6336$), las medias fueron (1) 30,7; (2) 28,8; (3) 28,7 y (4) 31,7. En conclusión, aunque no se demostró diferencia significativa entre los protocolos; la tendencia a la media más alta la presentó el protocolo 4 (glicerol 2,5%).

Palabras clave: criopreservación, L-glutamina + Etilenglicol, espermatozoide equino, semen equino.

* Médico Veterinario. Universidad de los Llanos, MSc Escuela Nacional Veterinaria de Nantes (Francia). PhD Universidad de Rennes (Francia). Investigador Corpoica. Correo electrónico: jneira@corpoica.org.co

** Médico Veterinario. Universidad de La Salle, MSc en Reproducción Universidad Austral de Chile, Profesor Facultad de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle. Correo electrónico: gramirez@hotmail.com

***Médicos Veterinarios, Universidad de La Salle.

Fecha de recepción: 13 de febrero de 2007.

Fecha de aprobación: 6 de septiembre de 2007.

EFFECT OF THE ASSOCIATION L-GLUTAMINE – ETHYLENE GLYCOL IN EQUINE SEMEN CRYOPRESERVATION

ABSTRACT

In order to improve the effectiveness in the cryopreservation of horse sperm, the effect of association L-glutamine with Ethylenglicole and Glycerol in the freezing media spermatozoa was evaluated. 4 Colombian native stallions were used to complete a total of 21 samples which were frozen in two different media: INRA 97 and cryoprotectant. The following study was done: L-glutamine 80mM + Etilenglicol 2.5% (protocol 1), L-glutamine 80 mM + Glycerol 2.5% (protocol 2), Etilenglicol 2.5% (protocol 3) and glycerol 2.5% (protocol 4). The freezing methodology was: 60 minutes to descend the temperature from 38°C to 5°C (0.55°C/min) during the transport. The samples were centrifuged at 600G/10min., and the semen was diluted with the four protocols in straws of 0.5 ml. Then, 60 minutes of equilibrium in refrigeration; 20 minutes in liquid nitrogen vapors and

then immersed. In the progressive motility evaluation there was not any significant difference between protocols at 0 time ($p \leq 0.6383$), at 30 minutes ($p \leq 0.511$), and at 60 minutes ($p \leq 0.1659$). The motility averages for the 4 protocols at 0 time were (1) $29,6 \pm 15,1$; (2) $28,1 \pm 13,5$; (3) $28,4 \pm 12,3$ and (4) $30,8 \pm 11,1$; at the 30 minutes: (1) $25,1 \pm 13,6$; (2) $22,3 \pm 13,0$; (3) $24,9 \pm 12,4$ and (4) $25,5 \pm 11,6$, and at 60 minutes (1) $17,1 \pm 10,2$; (2) $15,4 \pm 11,7$; (3) $19,9 \pm 11,5$ and (4) $17,6 \pm 10,4$. The spermatic survival was evaluated with eosine-nigrosine coloration, after thawing and there was not any significant difference among the protocols ($p \leq 0.6336$), the average measures were (1) 30,7; (2) 28,8; (3) 28,7 and (4) 31,7. As a conclusion, although significant difference was not demonstrated among the protocols; the tendency to the highest average was presented by the protocol 4 (glycerol 2.5%).

Key words: Cryopreservation, L-glutamine + ethylene glycol, equine spermatozoid.

INTRODUCCIÓN

Pese a los avances en la congelación de semen equino, existe una gran limitante para el desarrollo de esta biotecnología; ya que aún utilizando técnicas avanzadas de criopreservación, la sobrevivencia espermática postdescongelación está limitada a un 50% (Watson, 1995), debido a los efectos ejercidos por cambios de temperatura, alteraciones de membrana y daños producidos por elevadas concentraciones de crioprotectores. Además de esto, las técnicas de congelación de semen equino son menos eficaces que las de la especie bovina (Brinsko y Varner, 1992), porque los equinos presentan una sensibilidad más alta a la criopreservación seminal. Otro factor problema es la variación en la congelabilidad del semen entre reproductores, donde algunos toleran más la congelación de su material seminal en comparación con otros.

Debido a las bajas tasas de sobrevivencia y motilidad progresiva postdescongelación y a la marcada variabilidad individual en los resultados obtenidos en la criopreservación de semen equino, a través del presente trabajo se pretende evaluar la eficiencia de la L-glutamina asociada al etilenglicol; ya que éste por sus características físicoquímicas, como bajo peso molecular, mejor permeabilidad a través de la membrana y baja toxicidad, puede mejorar las tasas de sobrevivencia espermática y motilidad progresiva al momento de la descongelación en comparación con el glicerol, el cual ejerce un efecto negativo sobre la célula espermática debido a su alta toxicidad. Se ha trabajado la L-glutamina asociada al glicerol encontrando efectos favorables sobre el espermatozoide al momento de la descongelación (Trimeche, 1996), pero no se han realizado trabajos asociando esta molécula con el etilenglicol, que por las características anteriormente descritas, puede presentar mejores resultados postdescongelación.

El éxito en la criopreservación celular ha sido logrado gracias a la utilización de sustancias crioprotectoras que disminuyen la concentración intra y extracelular de electrolitos y la excesiva deshidratación celular a temperaturas bajo cero, reducen la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación. También inhiben la actividad de muchas enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y luego de la congelación y descongelación (Carpenter *et al.*, 1998). La criopreservación celular consiste en un enfriamiento de la célula a bajas temperaturas para lograr detener totalmente el metabolismo celular y así asegurar su conservación por largo tiempo.

Los crioprotectores pueden producir dos tipos de alteración a la célula, una funcional, que ocasiona inactivación proteica y enzimática; y otra estructural, relacionada con el estrés osmótico dado por los cambios de volumen experimentados por la célula espermática (Fahy, 1986).

CRIOPROTECTORES QUE PENETRAN LIBREMENTE LA CÉLULA

Son sustancias de bajo peso molecular que penetran fácilmente la célula, reemplazando el agua intracelular por medio de la introducción de radicales hidroxilo. Estos reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento y disminuyen el punto de congelación del agua (Medeiros, 2002), lo que combinado con una lenta tasa de enfriamiento disminuye la formación de cristales de hielo. Son esencialmente alcoholes (glicerol, etilenglicol, 1-2 propanediol, propilenglicol, entre otros). Sus pesos moleculares varían entre 32 y 212 Daltons.

CRIOPROTECTORES QUE NO PENETRAN LA CÉLULA

Son crioprotectores, que ejercen su acción protegiendo el exterior de la membrana celular que es frecuentemente lesionada por el efecto de las altas concentraciones iónicas; además algunas de estas moléculas tienen un efecto reparador de membrana, gracias a los lípidos que contienen (Whittingham, 1971). Pueden ser de bajo peso molecular como sacarosa, glucosa, manitol, trealosa y rafinosa, las cuales aumentan la presión osmótica extracelular produciendo la deshidratación de la célula (MacGann, 1978); o de alto peso molecular como el polivinil-pirrolidona (PVP), el Dextran, el suero de albúmina bovina, algunos aminoácidos como la L-glutamina, histidina y glicina – betaína.

La L-glutamina es un aminoácido que posee un efecto crioprotector en las células animales, en donde su mecanismo de acción es actuar de forma extracelular protegiendo la membrana plasmática del espermatozoide equino; lo cual permite una mejor protección al momento de la criopreservación y así una mejoría en la motilidad y viabilidad del espermatozoide al momento de descongelar, una vez asociada a otros crioprotectores como el glicerol.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECTA Y PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Las colectas del material seminal fueron realizadas en el criadero de caballos criollos colombianos Villa Daniela, ubicado en el Municipio de Cajicá (Cundinamarca), en la Sabana de Bogotá, a una altura de 2650 metros sobre el nivel del mar y una temperatura promedio de 13° C; para tal efecto se utilizaron cuatro ejemplares criollos colombianos, entre los 38 y los 60 meses de edad, que presentaron excelente líbido y habilidad para copular y liberar el semen en la vagina artificial.

La metodología empleada se basó en la utilización de cuatro crioprotectores aplicados a cada reproductor trabajado, cuya composición era desconocida para los evaluadores para evitar subjetividad. Las muestras se dividieron en siete lotes donde el máximo de reproductores por lote fue cuatro y el mínimo dos. Al reproductor número uno se le tomaron seis muestras; al reproductor número dos, siete; al reproductor número tres, seis y al reproductor número cuatro, dos; para un total de 21 muestras.

Para el desarrollo del trabajo se utilizó el medio INRA 97, adicionando a éste cuatro diferentes protocolos de congelación distribuidos como se aprecia en la Tabla 1.

TABLA 1. PROTOCOLOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA, ETILENGLICOL O GLICEROL COMO CRIOPROTECTORES EN MEDIO INRA 1997

PROTOCOLO	CRIOPROTECTORES
1	Etilenglicol 2.5% - L-glutamina 80mM
2	Glicerol 2.5%- L-glutamina 80mM
3	Etilenglicol 2.5%
4	Glicerol 2.5%

Para la colecta se dispuso de yeguas en celo, que permitieron servir de estímulo al macho en el momento de la toma del semen. Tanto el pene del reproductor como el área perineal de las yeguas fueron lavados con abundante agua, para evitar posibles contaminantes.

La colecta se realizó utilizando una vagina artificial tipo colorado preparada a una temperatura interna entre 45 – 50° C (Blanchard *et al.*, 2003), con buena lubricación (vaselina neutra), adecuada presión y con un protector plástico interno desechable que termina en el filtro de nylon para separar la porción

de gel. Una vez tomadas las muestras, se realizó un espermiograma convencional, teniendo en cuenta el volumen total, el volumen del gel, el color, la viscosidad, la motilidad progresiva a través del microscopio y la concentración espermática por medio de cámara de Neubauer. Posteriormente, el semen se diluyó en el medio INRA 97 (sin crioprotector) en relación 1:1, para su posterior transporte al laboratorio utilizando una nevera de icopor herméticamente cerrada para mantener la temperatura constante a 5° C.

Una vez en el laboratorio, el semen se centrifugó con el medio INRA 97 (utilizado para el transporte) a 600G durante 10 minutos. Luego se desechó el sobrenadante y se dejó el precipitado para ser diluido con cada uno de los cuatro protocolos, utilizando pajillas de 0,5 ml previamente marcadas. El sellamiento se realizó por medio de compresión de calor.

La curva de congelación utilizada fue inicialmente 10 minutos a 38° C, en tiempo de colecta y evaluación; luego 60 minutos para descender (0,55° C/min) y estabilizar la temperatura a 5° C durante el transporte al laboratorio; una vez adicionado el medio crioprotector, 60 minutos de tiempo de equilibrio en refrigeración; luego exposición a vapores de nitrógeno líquido a 4 cm de este durante 20 minutos y posterior inmersión en el nitrógeno líquido.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Las pajillas fueron descongeladas en baño de María a 37° C durante 30 segundos. Para la evaluación

postdescongelación se dispuso de viales de 1,5 ml para depositar el semen y homogenizarlo. Posteriormente se evaluó la motilidad progresiva al microscopio (40X, 100X), utilizando láminas templadas por medio de un calentador programable a 37,5° C. Adicionalmente, se realizó una prueba de resistencia observando la motilidad progresiva a los 30 y 60 minutos postdescongelación. Para la evaluación de sobrevivencia espermática se realizó tinción de eosina - nigrosina, para hacer el conteo de vivos y muertos al microscopio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete S.A.S. General Lineal Models Procedure. Realizando un análisis de varianza y un modelo de bloques completos al azar con arreglo factorial A x B x C (donde A = reproductor; B= tratamiento y C = evaluador) para ver la variación entre los cuatro protocolos utilizados. Para mirar el grado de significancia se utilizó la prueba de Tukey, con el fin de establecer cuál de estos marca la diferencia.

RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS EN CAMPO

De los cuatro reproductores se colectó un total de 21 muestras; a todas se le realizó una evaluación en campo, los valores promedio se encuentran en la Tabla 2.

TABLA 2. PROMEDIO DE VALORES SEMINALES POR REPRODUCTOR AL MOMENTO DE LA COLECTA EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL

REPRODUCTOR	VOLUMEN (ml) $\bar{X} + DS$	% MOTILIDAD PROGRESIVA $\bar{X} + DS$	MILLONES DE ESPERMATOZOIDES/ML $\bar{X} + DS$
1 (n=6)	24,8 ± 8.9	70 ± 0	285 ± 86.9
2 (n=7)	39,4 ± 6.7	69,2 ± 7.2	225,7 ± 53.9
3 (n=6)	47,8 ± 11.2	75 ± 5.5	255 ± 53.2
4 (n=2)	47,5 ± 10.6	65 ± 7.1	210 ± 7.1

* n= número de colectas por reproductor.

RESULTADOS DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA POSTDESCONGELACIÓN, SEGÚN EL PROTOCOLO UTILIZADO

Los resultados según el protocolo utilizado, fueron evaluados a diferentes tiempos, 0, 30 y 60 minutos postdescongelación. Los promedios obtenidos al tiempo cero fueron: protocolo (1) 29,6 ± 15,1; (2) 28,1 ± 13,5; (3) 28,4 ± 12,3 y (4) 30,8 ± 11,1. En los análisis estadísticos realizados al tiempo 0 no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.6383$), los resultados fueron homogéneos. En la evaluación después de los 30 minutos según el protocolo utilizado, la media de

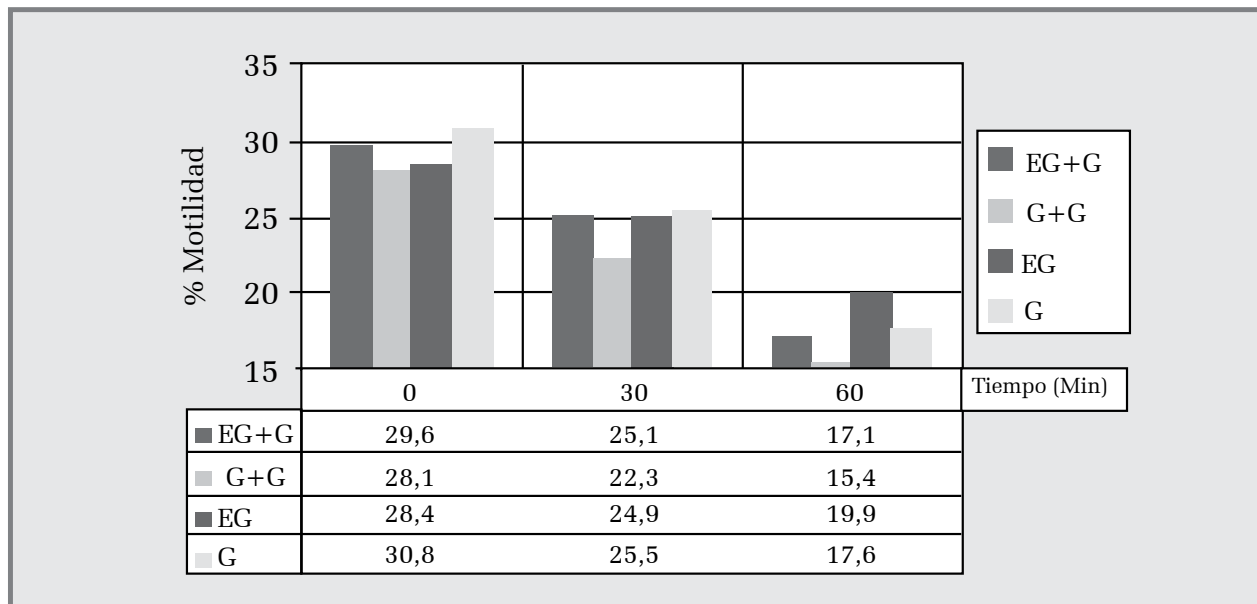
motilidad fue: protocolo (1) 25,1 ± 13,6; (2) 22,3 ± 13,0; (3) 24,9 ± 12,4 y (4) 25,5 ± 11,6. Los análisis estadísticos no encontraron significancia ($p \leq 0.511$). Sin embargo, los protocolos 1 y 4 (Etilenglicol + L-glutamina y Glicerol) fueron sobresalientes frente al 2 (Glicerol+L-glutamina) y al 3 (Etilenglicol). Después de 60 minutos postdescongelación los resultados obtenidos según los protocolos fueron; protocolo (1) 17,1 ± 10,2; (2) 15,4 ± 11,7; (3) 19,9 ± 11,5 y (4) 17,6 ± 10,4. No se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.1659$); sin embargo, el protocolo 3 (Etilenglicol 2.5%); presentó la tendencia más alta de motilidad progresiva, a través del tiempo (Tabla 3 - Gráfica 1).

TABLA 3. PROMEDIO DE MOTILIDAD PROGRESIVA SEGÚN EL PROTOCOLO DE CONGELACIÓN UTILIZADO A TRAVÉS DEL TIEMPO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL

TIEMPO POSTDESCONGELACIÓN	PROTOCOLO UTILIZADO	MOTILIDAD PROGRESIVA $\bar{X} + DS$
0	1	29,6 ± 15,1
	2	28,1 ± 13,5
	3	28,4 ± 12,3
	4	30,8 ± 11,1
30 Min.	1	25,1 ± 13,6
	2	22,3 ± 13,0
	3	24,9 ± 12,4
	4	25,5 ± 11,6
60 Min.	1	17,1 ± 10,2
	2	15,4 ± 11,7
	3	19,9 ± 11,5
	4	17,6 ± 10,4

*Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

GRÁFICA 1. PROMEDIO DE MOTILIDAD PROGRESIVA SEGÚN EL PROTOCOLO DE CONGELACIÓN UTILIZADO A TRAVÉS DEL TIEMPO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL



EG+G= Protocolo Etilenglicol + L-glutamina; G+G= Protocolo Glicerol + L-glutamina; EG= Protocolo Etilenglicol; G= Protocolo Glicerol. * Los análisis estadísticos realizados no demostraron diferencia significativa entre los protocolos, en los diferentes tiempos postdescongelación. Tiempo 0 (p = 0.6383); 30 min. (p = 0.511); 60 min. (p = 0.1659).

RESULTADOS DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA POSTDESCONGELACIÓN, SEGÚN EL REPRODUCTOR UTILIZADO

Las medias de motilidad progresiva según el reproductor utilizado, evaluadas al tiempo cero fueron: reproductor (1) 37,7 ± 12,5; (2) 20,8 ± 8,9; (3) 29,2 ± 8,9 y (4) 32,3 ± 19,1. El nivel de significancia fue (p ≤ 0.0001); donde el mejor reproductor fue el número uno, seguido por el cuatro, el tres y, finalmente, el número dos. Al tiempo 30 las medias fueron: reproductor (1) 29,4 ± 12,2; (2) 15,9 ± 8,9; (3) 25,9 ± 10,1 y (4) 34,7 ± 15,3. Encontrando una diferencia signifi-

ficativa (p ≤ 0.0001), donde el reproductor número cuatro fue el mejor, seguido por el uno, el tres y, por último, el dos. A los 60 minutos las medias fueron: reproductor (1) 18,8 ± 10,1; (2) 11,3 ± 7,5; (3) 20,1 ± 9,9 y (4) 27,8 ± 14,3. Encontrando diferencia significativa (p ≤ 0.0001) y el mejor reproductor fue el número cuatro (Tabla 4 - Gráfica 2).

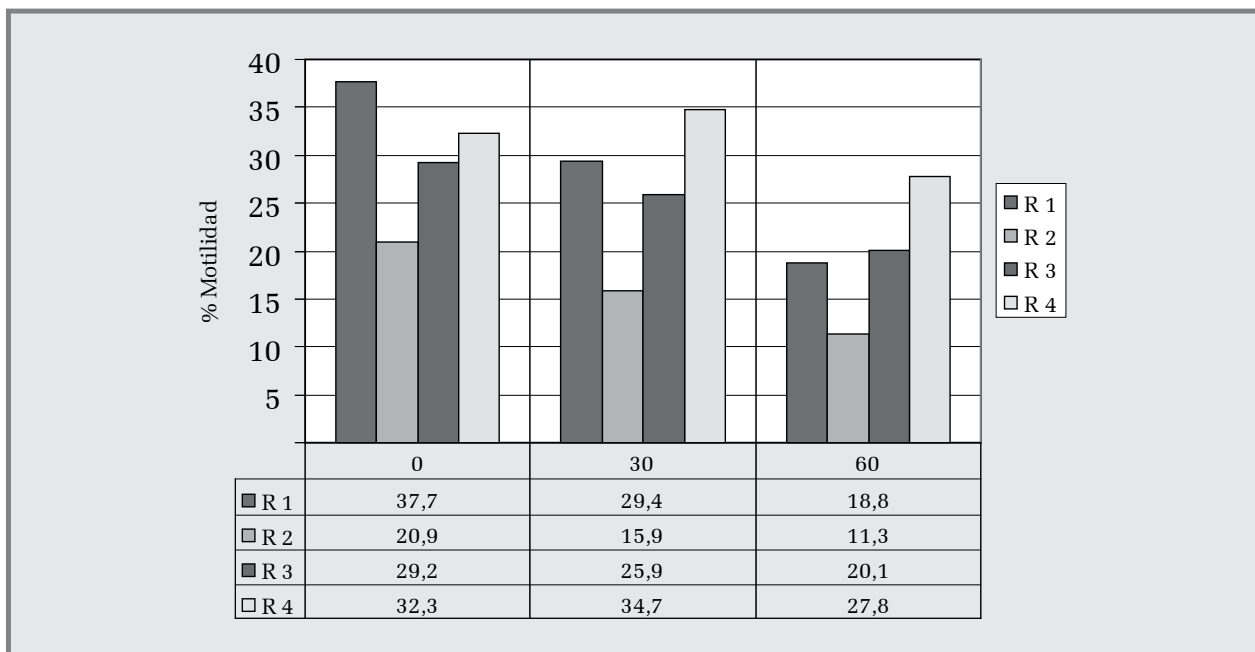
Las diferencias en los resultados de motilidad progresiva entre reproductores, demuestra la variabilidad existente en la especie en cuanto a la criopreservación seminal, dado que algunos reproductores toleran más que otros, la congelación de su material genético.

TABLA 4. MEDIA DE MOTILIDAD PROGRESIVA SEGÚN EL REPRODUCTOR UTILIZADO A TRAVÉS DEL TIEMPO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL

TIEMPO POSTDESCONGELACIÓN	REPRODUCTOR	MEDIA $\bar{X} \pm DS$
0	1	37,7 \pm 12,5 A
	2	20,8 \pm 8,9 C
	3	29,2 \pm 7,7 B
	4	32,3 \pm 19,1 AB
30 Min.	1	29,4 \pm 12,2 AB
	2	15,9 \pm 8,9 C
	3	25,9 \pm 10,1 B
	4	34,7 \pm 15,3 A
60 Min.	1	18,8 \pm 10,1 B
	2	11,3 \pm 7,5 C
	3	20,1 \pm 9,9 B
	4	27,8 \pm 14,3 A

* Las cifras marcadas con diferentes letras presentan diferencias significativas (A versus B $p < 0.05$ y versus C $p < 0.01$) *Letras iguales no presentan diferencia significativa.

GRÁFICA 2. PROMEDIO DE MOTILIDAD PROGRESIVA SEGÚN EL REPRODUCTOR UTILIZADO A TRAVÉS DEL TIEMPO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL



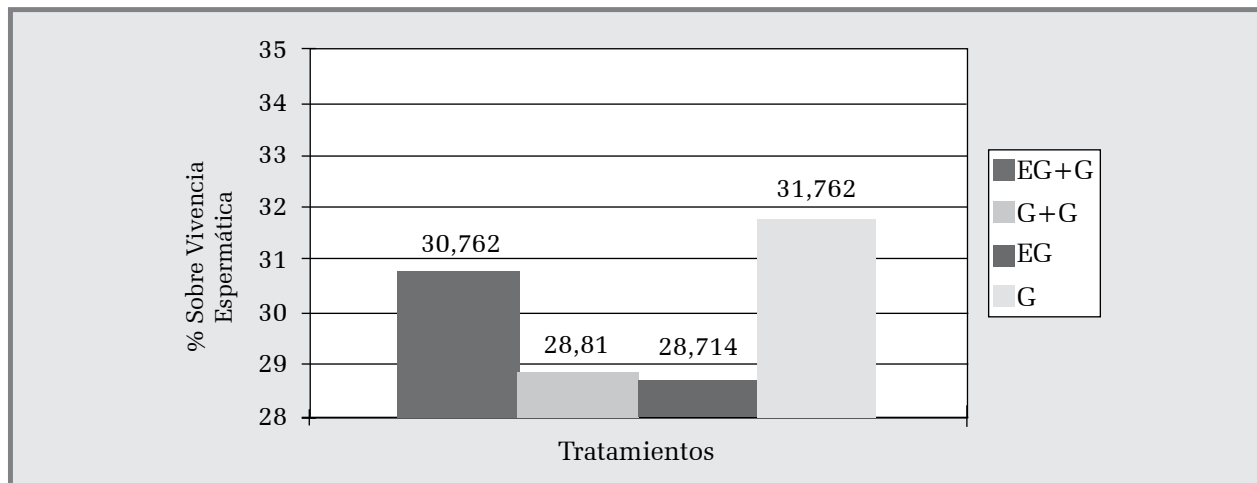
R= Reproductor Utilizado.

RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA SEGÚN EL PROTOCOLO UTILIZADO

Los promedios de porcentaje de sobrevivencia espermática, de acuerdo al protocolo utilizado, fueron los

siguientes: protocolo (1) 30,7%; (2) 28,8%; (3) 28,7% y (4) 31,7%. No se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.6336$). Mostrando tendencia a mayor supervivencia con el protocolo 4 (Glicerol 2,5%) (Gráfica 3).

GRÁFICA 3. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA SEGÚN EL PROTOCOLO DE CONGELACIÓN UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL



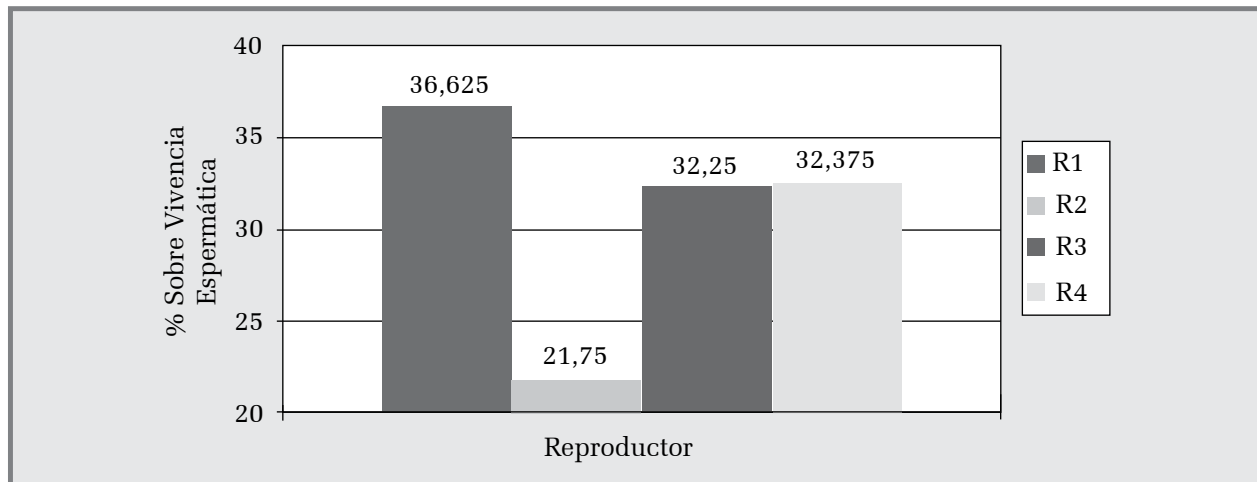
EG+G= Protocolo Etilenglicol + L-glutamina. G+G= Protocolo Glicerol + L-glutamina. EG= Protocolo Etilenglicol G= Protocolo Glicerol. * Los análisis estadísticos realizados no demostraron diferencia significativa entre los protocolos de congelación, según la sobrevivencia espermática. ($P \leq 0.6336$)

RESULTADOS DE SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA SEGÚN EL REPRODUCTOR UTILIZADO

En cuanto a la sobrevivencia espermática según el reproductor se obtuvieron los siguientes resultados promedio: reproductor (1) 36,6%; (2) 21,7%; (3) 32,2% y (4) 32,3%. Encontrando diferencia signifi-

cativa ($p \leq 0.0001$). El reproductor número uno, no presentó diferencia significativa con los reproductores tres y cuatro, pero sí con el dos; el reproductor dos presentó diferencia significativa con los demás; el reproductor tres no presentó diferencia significativa con el uno y el cuatro, pero sí con el dos; y el reproductor cuatro, no presentó diferencia significativa con el uno y el tres, pero sí con el reproductor número dos (Gráfica 4).

GRÁFICA 4. PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA SEGÚN EL REPRODUCTOR UTILIZADO EN EL ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN L-GLUTAMINA + ETILENGLICOL



R= Reproductor Utilizado. * Los análisis estadísticos realizados demostraron una diferencia significativa entre los reproductores, en cuanto a sobrevivencia espermática. ($P \leq 0.0001$)

DISCUSIÓN

Los resultados del espermograma de los cuatro reproductores al momento de la colecta, arrojaron valores seminales normales, teniendo en cuenta que para los equinos, el volumen sin gel varía entre 20 – 60 ml, dependiendo del reproductor y el número de colectas que se realicen por semana; el porcentaje de motilidad se encuentra entre 60 – 80% y la concentración oscila entre los 170 – 300 millones de espermatozoides (Palma, 2001). Los reproductores no mostraron problemas en cuanto a la criopreservación de su material seminal. La variabilidad en los resultados se debe a que en la especie equina algunos ejemplares muestran mayor sensibilidad a la criopreservación seminal (Alvarenga, 2003).

Existen diferentes estudios comparativos entre el Etilenglicol y el Glicerol; Alvarenga *et al.*, (2000) realizaron un estudio en el que compararon el Etilenglicol al 5%, al 10% y el Glicerol al 5%, encontrando resultados de motilidad progresiva de 36,5%, 29,25% y 34,5%, respectivamente. Otro estudio realizado por Mantovani (2002) arrojó resultados de motilidad de

47,9% para el Glicerol al 3% y 44,3% para el Etilenglicol al 3%. Como se puede ver en estos trabajos la diferencia no es significativa, pero existen mejores tendencias de uno sobre otro. En este estudio, no se encontró diferencia significativa entre los protocolos utilizados, sin embargo, al momento de la descongelación, el protocolo Glicerol al 2,5%, presentó la mayor motilidad progresiva promedio (30,8%), seguido por el protocolo propuesto L-glutamina 80mM + Etilenglicol 2,5%, que presentó una motilidad de 29,6%. A pesar de esto, el protocolo Etilenglicol 2,5%, mostró el comportamiento más homogéneo a través del tiempo, obteniendo la media más alta en la evaluación a los sesenta minutos postdescongelación. El glicerol al presentar la media más alta de motilidad progresiva y sobrevivencia espermática respecto a los demás protocolos, demuestra que la curva de congelación prolongada utilizada en el trabajo no es favorable para el etilenglicol, que por su fácil penetración celular y congelación rápida, al utilizar curvas de congelación largas se van a ejercer más efectos tóxicos sobre la célula que los ejercidos por el glicerol; ya que al dejarlo mucho tiempo expuesto, empieza a producir alteraciones celulares.

Es posible que al utilizar curvas de congelación más cortas, disminuyendo el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido, se obtengan mejores resultados con el etilenglicol. Por su parte, el glicerol a pesar de los efectos nocivos que ejerce sobre la célula; al penetrar más lentamente no alcanza a ejercer tanto daño como el etilenglicol.

La L-glutamina fue estudiada por Trimeche (1996) quien encontró valores de motilidad progresiva de $27,6\% \pm 5,0$, empleando la asociación de L-glutamina a 80 mM + Glicerol al 4%; como un agente sinergista en la criopreservación de semen equino, que actúa de manera extracelular ofreciendo protección a la célula. Además Trimeche (1999) utilizó la L-glutamina 80mM en el medio INRA 82, obteniendo resultados de motilidad progresiva a diferentes tiempos (0-60-120 minutos) de $35,9\% \pm 3,9$; $36,1\% \pm 3,7$; y $36,5\% \pm 3,5$.

A pesar de que los resultados obtenidos con la asociación L-glutamina + Etilenglicol no difieren de forma marcada con los que arrojó el protocolo Glicerol 2,5%; en términos generales, no se pudo resaltar el efecto de la L-glutamina como sinergista en la criopreservación de semen en la especie equina.

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, hecho que pudo ser debido a la curva de congelación utilizada y a las condiciones de transporte del material seminal, al laboratorio de congelación; en consecuencia, no se puede afirmar que estos protocolos no tuvieron el efecto planteado. Lo ideal sería realizar todo el procedimiento de criopreservación seminal en un mismo lugar, para evitar alteraciones en los espermatozoides ejercidas por inestabilidad de la temperatura y variaciones en el tiempo de transporte. Además es recomendable que se realicen otras curvas de congelación, disminuyendo el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno y otros procesos de evaluación como morfología espermática, integridad de membrana acrosómica y porcentajes de

preñez con los diferentes protocolos utilizados; ya que sólo la motilidad progresiva no es indicativa del factor fecundante.

CONCLUSIONES

No se logró demostrar el efecto benéfico de la L-glutamina, como sinergista en la criopreservación de semen equino y tampoco las mejores condiciones del Etilenglicol sobre el Glicerol, a pesar de su bajo peso molecular y mejor penetración celular.

Al asociar la L-glutamina 80mM con el Etilenglicol 2,5%, se obtienen mejores resultados en cuanto a motilidad progresiva y sobrevivencia espermática, respecto al Etilenglicol solo.

La curva de congelación utilizada no favorece el desempeño del Etilenglicol, en la criopreservación de semen equino. Se debe reducir el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno, según protocolos ya establecidos.

El protocolo Etilenglicol 2,5%, presenta resultados homogéneos a través del tiempo postdescongelación, ofreciendo un medio más adecuado para los espermatozoides, una vez descongelados.

RECOMENDACIONES

Realizar todo el proceso de congelación de semen equino en un solo sitio, desde la colecta del semen hasta la congelación del mismo, para evitar alteraciones que se pueden presentar durante su transporte, como la variabilidad de la temperatura y el tiempo de transporte que está sujeto a múltiples cambios ajenos a los operarios.

Utilizar curvas de congelación cortas, reduciendo el tiempo de exposición a vapores de nitrógeno líquido, para mejorar los resultados del etilenglicol sobre el glicerol; ya que por la rápida penetración celular que

posee el etilenglicol su congelación será más rápida y, por lo tanto, las curvas de congelación prolongadas lo que van a provocar es un mayor efecto nocivo sobre la célula.

Contribuir al avance de la criopreservación de semen equino, por medio de la utilización de crioprotectores alternativos con menos toxicidad como las amidas (metil-formamida, dimetil-formamida y acetamida).

Utilizar pajillas de 0,5 ml que permiten una congelación más uniforme de las células espermáticas y se va a aprovechar al máximo el semen, utilizando dosis menores y así obteniendo un mayor número de yeguas inseminadas.

Analizar la integridad celular postdescongelación con métodos más avanzados, como microscopía electrónica, coloraciones supravitales, filtros de fibra de vidrio y coloraciones fluorescentes, para evaluar viabilidad celular, alteraciones morfológicas e integridad de la membrana acrosómica.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarenga, M.A.; Moreira, R.M.; Cesarino, M.M. "Acrosomal ultra-structure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems". *Equine Veterinary* 32. (2000): 541 - 545.

Alvarenga, M.A. "Novos conceitos relacionados a congelação de semen de garanhões". Presentada IV Seminario internacional de reproducción de grandes animales. Bogotá, Septiembre 25, 26 y 27 de 2003.

Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Landim-alvarenga, F.C. and Medeiros, A.S.L. "Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review". Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine. São Paulo State University, UNESP-Botucatu, Brasil. 2005.

Ball, B.A. "Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential". *Journal Andrology* 22. (2001): 1061 - 1069.

Blanchard, L.; Varner, D.; Schumacher, J.; Love, C.; Brinsko, P.; Rigby, L. *Manual of equine reproduction*. (2 ed.). Mosby.

Brinsko, S.; Varner, D.D. "Artificial Insemination and Preservation of Semen". *Stallion Management Vet Clinics North America: Equine Practice*. 8. (1992): 205 - 218.

Brinsko, S.; Varner, D. D. and Blanchard, T. L. Transported Equine Semen. Department of Large Animal Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA. 17 April 2000.

Fahy, G.M. "The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology". *Cryobiology*. 23. (1986): 1 - 13.

Heather, A. "Preliminary comparisons of a unique freezing technology to traditional cryopreservation methodology of equine spermatozoa". *Journal of Equine Veterinary Science*. 24. 8. (2004): 314 - 318.

Keith, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Thesis Master of Science. Colorado State University, Fort Collins Colorado. 1998.

- Khelifaoui, M.; Battut, I.; Bruyas, J.; Chatagnon, G.; Trimeche, A. and Tainturier, D. "Effects of glutamine on post – thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level". *Theriogenology*. 63. (2005): 138-149.
- Losinno, L.; Aguilar, J. Reproducción y biotecnología en la producción equina. Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto Argentina. 2002.
- Mac Gann, L. "Differing action if penetrating and non – penetrating cryoprotective agents". *Cryobiology*. 15 (1978): 382 - 390.
- Mantovani, R. "Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test". *Reproduction nutrition and development*. 42. (2002): 217 - 226.
- Mazur, P. "Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing". *Cryobiology*. (1966): 213 - 315.
- Medeiros, A.; Gómez, G.; Carmo, M.; Papa, F. and Alvarenga, M. "Cryopreservation of stallion sperm using different amides". *Theriogenology*. 58. (2002): 273 - 276.
- Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D. and Rodrigues, J.L. "Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?" *Theriogenology*. 57. (2002): 327 - 344.
- Palma, G.A. *Biotecnología de la reproducción*. Argentina, 2001.
- Samper, J.C. "Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey". *Theriogenology*. 49. 5. (1998): 895 - 903.
- Samper, J.C.; Sánchez, R.; Gómez, I.; and Leite, B. "Artificial Insemination with Frozen Semen: Pregnancy Rates after Rectally Guided or Endoscopic Deposition". 51 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP. Seattle, WA, USA. 2005.
- Sánchez, R. "Más yeguas preñadas por semental". *Fedequinas*. 41. (2006): 124 - 127.
- Squires, E.L.; Keith, S.L. and Graham, J.K. "Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa". *Theriogenology*. 62. (2004): 1056 - 1065.
- Trimeche, A.; Yvon, J.; Vidament, M.; Palmer, E. and Magistrini, M. "Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post – thaw motility of stallion spermatozoa". *Theriogenology*. 52. (1999): 181 - 191.
- Trimeche, A. "Etudes sur fertilité et la cryopreservation du sperme du Baudet du poitou". Thèse Docteur de L'Université de Rennes. 1996.
- Vidament, M. "Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide". *Theriogenology*. 58. (2002): 249 - 251.
- Whittingham, D. *Culture of mouse ova*. Reproduction et fertilité. 14. (1971): 7 - 21.