

**OPTIMIZANDO PROTOCOLOS PARA MEJORAR EL BIENESTAR  
ANIMAL MEDIANTE LA CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO****Nadia Cristina Remezovski Luzko<sup>1</sup>**

Universidad de Buenos Aires - Argentina

**María Alejandra Stornelli<sup>2</sup>**

Universidad Nacional de La Plata - Argentina

**Marcelo Horacio Miragaya<sup>3</sup>**

Universidad de Buenos Aires – Argentina

**Recibido:** 18/12/2021**Aprobado:** 12/01/2022**RESUMEN**

El transporte del semen refrigerado y su uso mediante inseminación artificial (IA) es una práctica rutinaria en reproducción equina la cual evita el transporte de animales, reduce riesgos, estrés animal y costos de traslado y aumenta las posibilidades de uso de un reproductor (Douglas- Hamilton 1987). En las últimas décadas la IA con semen congelado en equinos ha adquirido gran importancia. La mencionada biotecnología permite almacenar material genético de valor y utilizarlo incluso cuando los padrillos ya no están disponibles, pudiendo distribuirse el material genético de un padrillo por todo el mundo. La refrigeración de semen diluido y su almacenado por algunas horas conservando parámetros seminales similares a los del semen fresco permitiría trasladar el semen hasta un laboratorio para su posterior congelamiento. Este hecho haría posible realizar la colecta de semen a campo y el traslado del eyaculado permitiendo el congelamiento sin necesidad de trasladar a los padrillos o contar con un laboratorio in situ. El objetivo fue estudiar la supervivencia espermática en semen equino luego de la refrigeración a 4°C durante 4 horas y post-descongelamiento. Se utilizaron 10 padrillos. Se recolectaron con vagina artificial dos eyaculados de cada animal. Luego del filtrado

<sup>1</sup> Becario de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, **BECAL PARAGUAY**.

[nadiareme@hotmail.com](mailto:nadiareme@hotmail.com)

<sup>2</sup> Profesor Asociado de la Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

[astornel@fcv.unlp.edu.ar](mailto:astornel@fcv.unlp.edu.ar)

<sup>3</sup> Profesor del área de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. [mmirag@fcv.uba.ar](mailto:mmirag@fcv.uba.ar)

se evaluaron las características macroscópicas: Color, Aspecto, Volumen (ml) y microscópicas: (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) Movilidad progresiva (MP); Porcentaje de vivos con tinción de Eosina – Nigrosina [% PV]; prueba de HOS ([% de colas enrolladas] post incubación en solución de lactosa 50mOsm). Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos) El semen filtrado fue diluido a una concentración de  $50 \times 10^6$  por ml en un diluyente base leche descremada-glucosa, almacenado a 4°C durante 4 h y posteriormente se realizó el congelamiento. En ambas etapas, el semen fue sometido a las pruebas de contrastación microscópicas descritas anteriormente. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA. La significancia fue establecida como  $p \leq 0,05$ . Se observaron valores semejantes de MP, VM, HOS y AI en semen fresco y luego de 4 hs de refrigeración. Así mismo, estos últimos se compararon con los valores post descongelamiento ( $57,6 \pm 4,8$  vs  $20,07 \pm 5,8$ ;  $66,5 \pm 2,8$  vs  $60,9 \pm 3,8$ ,  $66,5 \pm 3,5$  vs  $36,09 \pm 5,1$ ;  $80,4 \pm 2,6$  vs  $60,3 \pm 3,6$  respectivamente). Nuestros resultados sugieren que el semen refrigerado podría ser transportado y congelado luego de 4h de almacenado a 4°C permitiendo colectar en el campo y criopreservar en un laboratorio debidamente equipado sin necesidad de trasladar a los equinos. Futuros estudios permitirán profundizar los conocimientos en refrigeración por cortos periodos previos a la congelación.

**Palabras-clave:** Equino - Semen – Criopreservación.

## ABSTRACT

The transport of refrigerated semen and its use by artificial insemination (AI) is a routine practice in equine reproduction which avoids transporting animals, reduces risks, animal stress and transportation costs and increases the chances of using a breeder (Douglas-Hamilton 1987). In the last decades, AI with frozen semen in equines has acquired great importance. This biotechnology makes it possible to store valuable genetic material and use it even when stallions are no longer available, and the genetic material of a stallion can be distributed worldwide. Refrigerating diluted semen and storing it for a few hours while preserving semen parameters similar to those of fresh semen would allow the semen to be transferred to a laboratory for subsequent freezing. This would make it possible to collect semen in the field and transfer the ejaculate to a laboratory for freezing without the need to transport the stallions or to have a laboratory on site. The objective was to

study sperm survival in equine semen after refrigeration at 4°C for 4 hours and post-thawing. Ten stallions were used. Two ejaculates from each animal were collected with an artificial vagina. After filtration, macroscopic characteristics were evaluated: Color, Appearance, Volume (ml) and microscopic characteristics: (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) Progressive motility (PM); Percent live with Eosin - Nigrosin staining [% PV]; HOS test ([% rolled tails] post incubation in 50mOsm lactose solution). Intact acrosomes (AI, % intact acrosomes) Filtered semen was diluted to a concentration of 50 x10<sup>6</sup> per ml in a skim milk-glucose based diluent, stored at 4°C for 4 h and then frozen. In both stages, the semen was subjected to the microscopic contrast tests described above. The data obtained were analyzed by ANOVA. Significance was established as p≤0.05. Similar values of MP, VM, HOS and AI were observed in fresh semen and after 4 hs of refrigeration. Likewise, the latter were compared with post-thaw values (57.6±4.8 vs 20.07±5.8; 66.5±2.8 vs 60.9 ± 3.8, 66.5±3.5 vs 36.09±5.1; 80.4±2.6 vs 60.3±3.6 respectively). Our results suggest that refrigerated semen could be transported and frozen after 4h of storage at 4°C, allowing collection in the field and cryopreservation in a properly equipped laboratory without the need to transport the equines. Future studies will allow to deepen the knowledge on refrigeration for short periods prior to freezing.

**Keywords:** Equine - Semen - Cryopreservation

## 1. Introducción

El bienestar animal implica comprender que los animales son seres sintientes que llegan a experimentar dolor o estrés, es así que causar sufrimiento no es moralmente aceptable. Debido a esto, la cría y el trabajo con animales también están afectadas, tanto en calidad como en el desempeño. Brindar bienestar animal implica el compromiso de asegurar una buena calidad de vida, durante todo el ciclo vital del animal, desde el nacimiento hasta la muerte (Sanmartín- Sánchez 2015). Es así que evitar el estrés y riesgos del transporte animal es una de las metas en el bienestar equino. Los reproductores de gran desempeño deportivo son ampliamente requeridos para servicios, lo que implica el traslado de las hembras o de los padrillos para la realización de servicios. De esta manera el transporte del semen refrigerado y su uso mediante inseminación artificial (IA) es una práctica

rutinaria en reproducción equina la cual evita el transporte de animales, reduce riesgos, estrés animal, costos de traslado y aumenta las posibilidades de uso de un reproductor (Douglas- Hamilton 1987). En las últimas décadas la IA con semen congelado en equinos ha adquirido gran importancia a partir de la aceptación de su uso por varias asociaciones de criadores. La mencionada biotecnología permite almacenar material genético de valor y utilizarlo incluso cuando los padrillos ya no están disponibles, pudiendo distribuirse el material genético de un padrillo por todo el mundo. La refrigeración de semen diluido y su almacenado por algunas horas conservando parámetros seminales similares a los del semen fresco permitiría trasladar el semen hasta un laboratorio para su posterior congelamiento. Este hecho haría posible realizar la colecta de semen a campo y el traslado del eyaculado permitiendo el congelamiento sin necesidad de trasladar a los padrillos o contar con un laboratorio in situ.

## 2. Metodología

### 1. Animales Experimentales:

Se utilizaron 10 padrillos de raza Criolla Argentino de entre 5 y 8 años, clínicamente sanos y fértiles con descendencia en las últimas 3 temporadas reproductivas. Los animales se alojaron en boxes, con salidas diarias a piquetes, se alimentaron con dieta balanceada y tuvieron acceso libre al agua.

Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: Concentración (CON)  $\geq 170 \times 10^6/\text{ml}$ , Motilidad Progresiva (MOT)  $\geq 60\%$ , Vigor (VIG)  $\geq 3-4$ , (Porcentaje de espermatozoides vivos) PV  $\geq 60\%$ , Porcentaje de acrosomas normales (ACR)  $\geq 60\%$ , Morfología espermática (ME) espermatozoides normales  $\geq 60\%$ , HOS  $\geq 60\%$  de colas enrolladas (Sieme, 2009; Juhász J., 2000)

### 2. Colecta de Semen:

Los eyaculados fueron obtenidos a través de estimulación con una yegua en celo durante la estación reproductiva (septiembre-diciembre), recolectando el semen en una vagina artificial tipo Missouri (Estrada 2007).

### 3. Evaluación de la calidad seminal:

Las muestras de Semen fresco fueron sometidas a las siguientes pruebas de evaluación

3.3.1 Motilidad Progresiva (MP) una gota de 10 ul de semen fresco se colocó en un portaobjetos limpio a 37°C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó mediante un sistema de análisis computarizado CASA (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) utilizando platina termostaticada, se estimó en varios campos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Estrada, 2007).

3.3.2 Evaluación de Integridad de membrana. Porcentaje de vivos (PV), se colocó 10 ul de semen con 10 ul de colorante eosina-azul de anilina sobre un portaobjetos a 37°C. Se mezclaron las gotas durante 30 segundos sobre platina térmica a 37°C. Se realizó un extendido y se observó por microscopía a 1000 X (Estrada, 2007) (Tittarelli, 2006)

3.3.4 Prueba de HOS (HOS). Se evaluó la funcionalidad de la membrana espermática mediante la prueba de HOS agregando 100 µl de semen a 1000 µl de una solución de 50mOsm de Lactosa. Se observó con microscopio de contraste de fase a 400 X y se determinó el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas (Neild, 1999; Neild, 2000; Wrench, 2010).

3.3.5 Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas normales), una muestra de semen se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (Mendoza, 1992; Zhuangyuan, 2015).

#### 4. Diseño experimental

Se procesaron 16 eyaculados. El semen puro se filtró, y se determinó el volumen. Se tomó una alícuota para determinar la concentración espermática (CE 106/ml), la cual se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer (Samper, 2009) este parámetro permitió realizar la dilución a  $50 \times 10^6$  / ml (Juhász J., 2000) con un diluyente base leche descremada KENNEY (Palma, 2001; Samper, 2009), se fraccionó en tubos Falcon de 50 ml, y las muestras fueron colocadas en un Equiteiner a 5°C. tras 4 hs de refrigeración, se realizaron las pruebas de evaluación[on de la calidad seminal como se mencionó anteriormente, luego se centrifugó a 275 G por 7 minutos (Cochram, 1984; Magistrini, 2000; Squieres, 2004), se descartó el sobrenadante y fue re-diluido en el DIL de congelación Lactosa-EDTA- yema de huevo (Glucosa 59,985 g, Citrato de sodio, 2 H<sub>2</sub>O 3,7

g, EDTA disódico 3,699 g, Bicarbonato de sodio ( $\text{NaCO}_3\text{H}$ ) 1,2 g. Polimixina B sulfato 1 millón UI) con 20% de yema de huevo, 11% de lactosa, 5% de DMF. Dos eyaculados (EYA) de cada padrillo se fraccionaron y mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego del envasado en pajuelas de 0,5 ml, el semen se equilibró 1,5hs a  $4^\circ\text{C}$  y posteriormente se congeló sobre vapores de nitrógeno líquido (Melo, 2007; Gomes 2002; Cochram, 1984). La descongelación del semen se realizó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 minuto. El semen congelado-descongelado fue sometido a las mismas pruebas de evaluación de la calidad seminal mencionadas.

### 3. Análisis de los resultados

Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA. La significancia fue establecida como  $p \leq 0,05$ .

No se observaron diferencias significativas entre MP, VM, HOS y AI en semen fresco y luego de 4 hs de refrigeración. Así mismo, estos últimos se compararon con los valores post descongelamiento ( $57,6 \pm 4,8$  vs  $20,07 \pm 5,8$ ;  $66,5 \pm 2,8$  vs  $60,9 \pm 3,8$ ,  $66,5 \pm 3,5$  vs  $36,09 \pm 5,1$ ;  $80,4 \pm 2,6$  vs  $60,3 \pm 3,6$  respectivamente) obteniéndose valores aceptables para su posterior uso mediante IA.

**Tabla 1: Pruebas de contrastación realizadas al semen fresco y congelado-descongelado**

	MP	PV	HOS	AI
<b>REFRIGERADO</b>	$57,6 \pm 4,8^a$	$66,5 \pm 2,8^a$	$66,5 \pm 3,5^a$	$80,4 \pm 2,6^a$
<b>DESCONGELADO</b>	$20,07 \pm 5,8^b$	$60,9 \pm 3,8^b$	$36,09 \pm 5,1^b$	$60,3 \pm 3,6^b$

Valores obtenidos en las Pruebas de contrastación realizadas al semen fresco y congelado-descongelado. Valores expresados en promedios  $\pm$  error estándar. Letras diferentes expresan diferencias ( $p \leq 0,05$ )

### 4. Conclusiones

En el presente estudio, se compararon La MP, PV, HOS Y AI entre semen fresco, posterior a 4 hs de refrigeración y post descongelado. No se observaron diferencias significativas entre el semen fresco y posterior a 4 hs de refrigeración, sin embargo, se

observaron diferencias significativas entre este último y el semen congelado-descongelado. Esto es esperable ya que las membranas espermáticas (plasmática y acrosomal) son el principal sitio de impacto de los procesos de criopreservación y donde ocurren los primeros daños celulares. Las bajas temperaturas ocasionan tanto daños estructurales como funcionales que afectan la capacidad fecundante del espermatozoide. Paralelamente, reducen su longevidad dando origen a cambios similares a la capacitación (Colebrader, 2011).

No se encontraron diferencias significativas en los diferentes parámetros evaluados in vitro cuando se compararon el semen fresco y posterior a 4 hs de refrigeración, lo que permite hipotetizar que el uso del semen refrigerado para su posterior congelamiento en el laboratorio tras 4 hs de refrigeración es altamente prometedor. Esta práctica haría posible colectar la muestra en el campo sin la necesidad de transporte animal evitando los riesgos de transporte tanto para el padrillo hacia el laboratorio para criopreservar semen, como de las hembras hacia el centro de inseminación; pudiendo transportarse el semen criopreservado. Implementando estas biotecnologías se impulsa el bienestar animal preservando la salud equina.

## 5. Referencias bibliográficas.

- Cochram, J., Amann, R., & Pickett, D. F. (1984). Effects of centrifugation, Glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate on the post thaw motility of equine semen. *Theriogenology*.
- Colebrader, B. (2011). Techniques for Evaluating Frozen Semen. In M. K. A.O, *Equine Reproduction, Second Edition* (Vol. 2).
- DH Douglas-Hamilton, PJ Burns, DD Driscoll, KM Viale - *J Reprod Fertil*, (1987). Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen.
- Estrada, A., & Samper, J. (2007). "Evaluation of Raw Semen". In J. En Samper, J. Pycocck, & McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp. 253-257). Missouri, USA: Saunders: Elsevier.
- Gomes, G., Jacob, J., Medeiros, A., F.O.Papa, & Alvarenga, M. (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* (58), 277-279.

- Juhász J., N. P. (2000). Review Article: Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a Review. *Acta Vet.*(69), 247–25.
- Magistrini, M. (2000). “Semen Evaluation”. In J. Samper, *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Philadelphia: Saunders Company.
- Melo, C. Z. (2007). Influence of Semen Storage and Cryoprotectant on Post-thaw Viability and Fertility of Stallion Spermatozoa. *Elsevier Inc*, 4(27), 171-175.
- Mendoza C., C. A. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. *J. Reprod. Fertil*(95), 755-763.
- Neild D.M., C. M. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrología*, 32(6):351-355.
- Palma, G. A. (2001). *Biotecnologías de la reproducción*.
- Samper, J. C. (2009). *Equine Breeding Management and Artificial Insemination 2nd Edition*. S.T. Louise; Missouri: Saunders Elsevier.
- Sanmartín- Sánchez L, Perea J, Blanco I Penedo, Pérez–Rico A y Vega–Pla JL.. *Bienestar animal en equinos (Equus Caballus): una evaluación comparativa en reproductores del sur de España*. Revista Científica FCV-LUZ, vol. XXV, no. 6, pp. 471-480, 2015
- Sieme, H. (2009, p57-74). *Semen evaluation in Semper* . Saunders Elsevier.
- Squieres EL, K. S. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*(62), 1056-1065.
- Tittarelli C.M., S. C. (2006). Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, 66: 1637-1640.
- Wrench, N., Pinto, C., Klinefelter, G., Dix, D., Flowers, W., & Farin., C. (2010). Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*(119), 219-227.
- Zhuangyuan, W., Xinbiao, Z., Yongming, L., Fei, H., Hong, D., Guoting, Z., . . . Jingbo., C. (2015). Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*(163), 163.