



Universidad Científica del Sur

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“EVALUACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES DE
DIMETILACETAMIDA (3%, 4% Y 5%) EN EL PROCESO DE
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN CABALLO PERUANO DE
PASO”**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

SAMANTHA GALLO MIRANDA

BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA-PERÚ

2014

DEDICATORIA

A mis padres, a quienes les debo todo.
Sin ellos no hubiera llegado donde estoy,
ni hubiera sido quien soy. Gracias.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
II.1. LA CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL.....	3
II.1.a. IMPACTO SOBRE LA CÉLULA ESPERMÁTICA.....	5
a. SHOCK TÉRMICO Y EL DAÑO EN LAS MEMBRANAS.....	10
b. CRIOCAPACITACIÓN.....	15
II.1.b. DILUTORES.....	17
II.1.c. CRIOPROTECTORES.....	18
a. DIMETILACETAMIDA.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
III.1. HIPÓTESIS.....	25
III.2. OBJETIVO GENERAL.....	25
III.3. ANIMALES Y LUGAR.....	25
III.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	25
III.5. DILUTORES.....	26
III.6. COLECCIÓN SEMINAL.....	26
III.7. DILUCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL SEMEN.....	27
III.8. PROCESO DE REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN.....	27
III.9. EVALUACIÓN SEMINAL.....	28
III.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
III.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
IV. RESULTADOS.....	32
V. DISCUSIÓN.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

VIII. ANEXOS..... 52

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Espermatozoides sometidos a la prueba HOS. Todos excepto el espermatozoide “A” son reactivos postivamente a la prueba, por la hinchazón distal a proximal de sus colas29

FIGURA 2: Espermatozoides sometidos a la prueba de Doble Tinción. Los espermatozoides "A" y "C" están vivos por su citoplasma sin teñir y los espermatozoides “B” y “D” tienen el acrosoma intacto pues está teñido30

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Resultados de motilidad progresiva, integridad de membrana e integridad acrosomal en semen de Caballo Peruano de Paso refrigerado por 30 minutos usando la dimetilacetamida como crioprotector en tres concentraciones diferentes (3%, 4% y 5%)32
CUADRO 2: Resultados de motilidad progresiva, integridad de membrana e integridad acrosomal en semen descongelado de Caballo Peruano de Paso usando la dimetilacetamida como crioprotector en tres concentraciones diferentes (3%, 4% y 5%)33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Análisis estadístico de los resultados luego de la refrigeración a 5°C52
ANEXO 2: Análisis estadístico de los resultados luego de la congelación a -196°C55
ANEXO 3: Evaluación de las variables luego de la refrigeración a 5°C58
ANEXO 4: Evaluación de las variables luego de la congelación a -196°C60
ANEXO 5: Representación gráfica de los resultados obtenidos luego de la refrigeración a 5°C62
ANEXO 6: Representación gráfica de los resultados obtenidos luego de la congelación a -196°C65
ANEXO 7: Imágenes de la preparación de los dilutores68
ANEXO 8: Imágenes de la preparación de la vagina artificial69

ANEXO 9: Imágenes de la colección seminal69
ANEXO 10: Imágenes del procesamiento en el laboratorio70
ANEXO 11: Imágenes de la evaluación seminal71

RESUMEN

La dimetilacetamida (DMA) es uno de los crioprotectores que brinda los mejores resultados durante la criopreservación del semen equino. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar 3 concentraciones (3, 4 y 5%) de DMA en la criopreservación de semen de Caballo Peruano de Paso. Para tal efecto, un total de 14 eyaculados provenientes de 3 potros fueron colectados, procesados y evaluados. Las muestras seminales fueron transportadas al laboratorio, separadas del plasma seminal por centrifugación y diluidas en un medio Kenney. Se formaron 3 grupos en donde se agregó la DMA en las siguientes concentraciones: 3%, 4% y 5%. Por cada grupo se cargaron 3 pajillas, las cuales fueron sometidas a una curva de enfriamiento hasta los 5°C y luego congeladas en un sistema de criopreservación controlada. El descongelamiento de las pajillas se realizó en baño maría a 39°C. Se observaron las muestras en un microscopio para evaluar la motilidad progresiva; se utilizó el test hipoosmótico para evaluar la integridad funcional de membrana, y la técnica de doble tinción azul tripan/giemsa para evaluar la viabilidad/integridad acrosomal. Los resultados obtenidos luego del enfriamiento señalan que con DMA 3% y DMA 4% se obtienen mejores parámetros de motilidad progresiva, en comparación con DMA 5% ($p < 0.05$); mientras que los porcentajes de integridad funcional de membrana y de integridad y viabilidad acrosomal, luego del congelado/descongelado fueron similares entre los grupos. En conclusión, las tres concentraciones evaluadas de DMA consiguen de manera uniforme una buena protección celular para el espermatozoide a lo largo del proceso de criopreservación del semen de Caballo Peruano de Paso, siendo dicha amida un crioprotector de bajo peso molecular, fácilmente penetra al interior y protege la célula de la formación de cristales intracitoplasmáticos.

Palabras Clave: Criopreservación; Semen; Caballo Peruano de Paso; Crioprotector; Dimetilacetamida.

SUMMARY

Recent reports have shown encouraging data respecting the use of amides, such as dimethylacetamide (DMA), as good cryoprotectants for stallions. The objective of this study was to evaluate three concentrations of DMA (3%, 4% or 5%) in order to determine which was suitable for the cryopreservation of Peruvian Paso horse sperm. A total of 14 ejaculates from 3 horses were collected, processed and evaluated. The seminal samples were transported to the laboratory, separated from the seminal plasma by centrifugation, and diluted in a freezing medium. Pooled semen samples diluted in freezing medium containing 3%, 4%, or 5% DMA were loaded in straws and submitted to a controlled cryopreservation system up to 20°C , and then plunged into liquid nitrogen. The thawing of the straws was in warm waterbath at 39°C . The variables assessed after thawing were sperm progressive motility (observed through a microscope), membrane functional integrity (an hypoosmotic test was used), and viability and acrosome integrity (a tripan/ giemsa tinction was used). Analysis of variance was used for statistical analysis by ANOVA, the significance level was set at $P < 0.05$. The results after thawing demonstrated that the functional membrane integrity and the viability and acrosomal integrity, had similar results among the groups. In conclusion, under our experimental conditions, none of the three DMA concentrations evaluated had significant differences; however, they achieved in a uniform way, a good sperm cellular protection among the Peruvian Paso Horse semen cryopreservation process.

Key words: Cryopreservation; Semen; Sperm; Peruvian Paso horse; Cryoprotectant; Dimethylacetamide.