



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE
REFRIGERACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA
MEMBRANA ESPERMÁTICA EN SEMEN DE PADRILLOS DE LA
LÍNEA ZANGERSHEIDE”**

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:

Adriana Antonell Espinoza Girón (0000-0002-8859-3247)

Asesor:

Alexei Vicent Santiani Acosta (0000-0001-9740-5490)

Lima – Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 29 de diciembre del 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro: M.V.Z. PAULA LUCIA QUIJANO SAAVEDRA
Miembro: M.V.Z. CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN SEMEN DE PADRILLOS DE LA LÍNEA ZANGERSHEIDE"

Presentada por la bachiller:

ADRIANA ANTONELL ESPINOZA GIRÓN

Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario Zootecnista**

Asesorada por el: **Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesista: ADRIANA ANTONELL ESPINOZA GIRÓN	Nota: Diecisiete		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Presidente



Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Asesor



M.V.Z. PAULA LUCIA QUIJANO SAAVEDRA
Miembro 1



M.V.Z. CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS
Miembro 2

DEDICATORIA

A las personas más importantes en mi vida, quienes son mi sustento y motivación, mi familia, en especial a mi madre, quien confió en mí y me ayudó a lograr cada una de mis metas universitarias, por todos sus consejos, sacrificios, amor y por seguir siendo mi apoyo en todo momento.

A mis papitos, Isidro y Filomena, quienes sembraron en mí el amor a Dios y el respeto a los animales, por ser siempre mi ejemplo a seguir.

A mi chinis Juan Carlos, por siempre darme aliento y motivarme a ser mejor.

A los tres sementales, que sin ellos no hubiera sido posible realizar este proyecto, y quienes se ganaron todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios, se que fue Él quien guió cada uno de mis pasos y quien puso en mi camino cada persona que ha hecho posible este logro.

A mi familia, quienes me ayudaron de diferentes maneras y me motivan siempre, aún en los peores momentos.

A mis asesores, Dr. Alexei Santiani Acosta, Dra. Shirley Evangelista Vargas, por toda su paciencia, enseñanzas durante mi vida universitaria y proyecto de tesis, disposición, tiempo y confianza depositada en mí.

Al Hospital Veterinario Central del Ejército del Perú, al personal de tropa, por siempre estar dispuestos a ayudar, al Tte Crl EP. Carlos Millones Flores por su confianza y aprecio, y en especial al Tte Crl EP. Rodobel Olmos Acevedo, mi coasesor, quien siempre estuvo dispuesto a enseñarme, aconsejarme, alentarme, por confiar en mí y mis capacidades, y por todos esos días de arduo trabajo durante las colectas.

A mis maestros de la universidad, de quienes aprendí no sólo bases para mi formación profesional, sino también a ser mejor persona y sentirme siempre orgullosa de mi carrera, Medicina veterinaria y zootecnia.

RESUMEN

La inseminación artificial en mejora genética equina es una técnica recurrente debido a la habitual lejanía geográfica entre los parentales seleccionados. La disponibilidad de semen fresco es fundamental para este fin y por ello se vuelve importante conocer el impacto del tiempo de refrigeración sobre la calidad seminal, ya que tiempos prolongados de refrigeración pueden deteriorar la integridad funcional de la membrana espermática y por tanto disminuir la tasa de éxito de preñez. Los tiempos y efectos se desconocen en la línea Zangersheide. Por consiguiente, el presente estudio tuvo como objetivo realizar una evaluación del efecto de la refrigeración a diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas) sobre la integridad funcional de la membrana espermática en semen de padrillos de la línea Zangersheide; a través de la utilización del test hipoosmótico (HOST). Tres padrillos de fertilidad comprobada pertenecientes al Hospital Veterinario Central del Ejército Peruano fueron utilizados para colectar un total de quince muestras de semen (cinco muestras por padrillo). Las variables analizadas fueron tiempo de refrigeración (variable independiente) y porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de la membrana espermática (variable dependiente). Los resultados de la presente investigación evidenciaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) que en los tres tiempos evaluados de cada semental la integridad funcional de membrana sigue una distribución normal ($P > 0.05$). El porcentaje de integridad funcional de membrana espermática en los tres tiempos fue $70 \pm 5.64 \%$, $55.2 \pm 5.55 \%$ y $38.2 \pm 6.56 \%$, correspondientes a los tiempos de refrigeración 0, 24 y 48 horas respectivamente, existiendo diferencias ($p < 0.001$) entre los 3 grupos (Anova y Post Test Tukey). Como conclusión, el tiempo de refrigeración influye significativamente sobre la integridad funcional de la membrana espermática, siendo recomendable utilizar el semen para inseminación como máximo a las 24 horas, con el fin de obtener una mayor probabilidad de preñez.

Palabras clave: Integridad funcional de la membrana espermática, Zangersheide, test hipoosmótico, refrigeración

ABSTRACT

Artificial insemination in equine breeding is a recurrent technique due to the usual geographical remoteness of the selected parents. The availability of fresh semen is fundamental for this purpose so it is important to know the impact of refrigeration time on semen quality, since prolonged refrigeration time can deteriorate the functional integrity of the sperm membrane and as a result decrease the pregnancy success rate. However, the effect of time is unknown in the Zangersheide line. Therefore, the present study aimed to perform an evaluation of the effect of refrigeration at different times (0, 24 and 48 hours) on the functional integrity of the sperm membrane in semen from Zangersheide stallions; through the use of the hypoosmotic test (HOST). Three stallions of proven fertility belonging to the Central Veterinary Hospital of the Peruvian Army were used to collect a total of fifteen semen samples (five samples per stallion). The variables analyzed were refrigeration time (independent variable) and percentage of spermatozoa with functional integrity of the sperm membrane (dependent variable). The results of the present investigation showed by means of the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test that in the three evaluated times of each stallion the functional integrity of the membrane follows a normal distribution ($P > 0.05$). The percentage of sperm membrane functional integrity in the three times was $70 \pm 5.64 \%$, $55.2 \pm 5.55 \%$ and $38.2 \pm 6.56 \%$, corresponding to the cooling times 0, 24 and 48 hours respectively, with differences ($p < 0.001$) between the 3 groups (Anova and Tukey Post Test). As a conclusion, the refrigeration time significantly influences the functional integrity of the sperm membrane, being suggested to use the semen for insemination at a maximum of 24 hours, in order to obtain a higher pregnancy probability.

Keywords: Functional integrity of the sperm membrane, Zangersheide, hypoosmotic test, refrigeration

Efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de la membrana espermática en semen de padrillos de la línea Zangersheide

Effect of cooling time on the functional integrity of the sperm membrane in spermatozoa from stallions of the Zangersheide line

Refrigeración e integridad funcional de membrana en espermatozoides equinos

Adriana Antonell Espinoza – Girón¹, Alexei Vicent Santiani Acosta²,

Rodobel Olmos Acevedo^{3,4}

¹Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

²Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú

⁴Facultad de ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Autor responsable de la correspondencia del trabajo

Alexei Santiani

Dirección: Av, Circunvalación 2800, San Borja

Teléfono: +51 992 754 758

Fax: s/n

Email: asantiania@unmsm.edu.pe

Página web: www.unmsm.edu.pe

Fuente financiera: autofinanciamiento

Artículo derivado de la tesis: “Evaluación del efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de la membrana espermática en semen de padrillos de la línea Zangersheide”

INTRODUCCIÓN

Una realidad desafiante para el mejoramiento genético en equinos es que los parentales seleccionados para el apareamiento están muchas veces alejados geográficamente entre sí. Existen dos formas de almacenamiento y conservación del semen: la refrigeración y la criopreservación. Estas pueden ser aplicadas siempre y cuando se evalúe de manera independiente la muestra seminal de cada padrillo, puesto que, según estudios realizados, sólo entre el 30-40% de los padrillos eyaculan semen apto para la congelación (Alvarenga et al., 2003).

Ante la necesidad de disponer de semen lo más fresco posible para la inseminación, se vuelve importante conocer el impacto del tiempo de refrigeración en la calidad de este. Existen reportes en los cuales mencionan que tiempos prolongados de refrigeración pueden deteriorar la integridad funcional de la membrana espermática y por tanto disminuir la tasa de éxito de preñez, ya que una membrana plasmática bioquímicamente activa es esencial para que se dé el metabolismo del espermatozoide e indispensable para la fecundación, aún cuando se cuenta con espermatozoides morfológicamente intactos (Giraldo et al., 2006; Rubio et al., 2009), puesto que la membrana espermática se ve involucrada en el reconocimiento y transporte de moléculas que permiten la adaptación del metabolismo espermático al medio circulante, brindándole un sistema molecular que le permite reconocer al oocito (Hammerstedt et al., 1990). Por ello, la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática es de suma importancia. Para determinar dicho parámetro se puede utilizar el Test Hipoosmótico (HOST, del inglés hypo-osmotic swelling test), también conocido como Prueba de hinchazón hipoosmótica (Prueba HOS), considerada como la técnica más apropiada para este fin (Giraldo et al., 2006; Neild et al, 1999), además de ser un método simple y económico (Zeidan et al., 2018) permite determinar el porcentaje de espermatozoides que se enrollan o rizan como consecuencia del ingreso de agua.

El principio consta en la exposición de los espermatozoides a un medio hipoosmótico, donde el agua ingresará al espermatozoide con el fin de intentar obtener el equilibrio osmótico. De esta manera incrementa el volumen celular, produciendo una reducción de la longitud inicial del flagelo y las protuberancias de la membrana plasmática (Drevious & Ericksson, 1966; Bredderman & Foote, 1969).

La hinchazón se da en respuesta al estrés osmótico, permitiendo medir la integridad funcional de la membrana plasmática (Jeyendra et al., 1984). Esta reacción de las células se produce por las propiedades celulares intrínsecas que definen la tasa de transporte hídrico hacia y a partir de las células, como la composición de fosfolípidos de la membrana, la disposición de agua y proteínas de los canales de iones y citoesqueleto (Hoffmann et al., 2009).

Sin embargo, estos tiempos y efectos se desconocen en la línea Zangersheide. Por consiguiente, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de la membrana espermática en padrillos de la línea Zangersheide.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de estudio

Se emplearon tres padrillos (*Equus ferus caballus*) de la línea Zangersheide, de fertilidad comprobada, pertenecientes al Hospital Veterinario Central del Ejército Peruano (Chorrillos, Lima-Perú). Estos fueron previamente seleccionados mediante un examen clínico andrológico, donde se evalúa el descenso de ambos testículos, los cuales deben estar libres de lesiones o anormalidades. El rango de edades estuvo comprendido entre los 10 y 17 años, y el peso corporal aproximado fue de 500 ± 20 Kg. Como criterio de inclusión se seleccionaron todas las muestras cuya motilidad progresiva sea mayor o igual a 65%. Contrariamente, como criterio de exclusión, se planeó descartar toda muestra que no sea del color característico de una muestra seminal, es decir, blanco lechoso y muestras de bajo volumen (menores a 20 ml).

Colecta y Evaluación seminal

Se realizaron una serie de colectas cada 24 horas entre las 6:00 y las 7:00 a.m. durante siete días, con el fin de eliminar las reservas extragonadales, que constan de espermatozoides que se encuentran almacenados largos periodos de tiempo en el epidídimo, los cuales no son aptos para ser sometidos a refrigeración y por ende la fertilización (Canisso et al, 2008; Amann y Pickett, 1987).

La colecta de semen se realizó mediante el uso de yeguas en celo y una vagina artificial tipo Missouri a 42 - 44°C de temperatura (Seminario, 2020; Serres, 2012), a la cual se le colocó una camisa sanitaria, para evitar la contaminación entre una muestra y otra, la cual fue lubricada con gel no espermicida. Las yeguas utilizadas fueron examinadas y observadas regularmente, seleccionando a toda yegua que tenga una buena condición corporal, que muestra signos de celo y/o con folículo mayor o igual a 35 mm de diámetro, lo cual fue obtenido mediante ultrasonografía. Asimismo, se preparó al padrillo lavándole la superficie peneana con algodón humedecido en agua a 37 °C y secado con papel toalla,

lo cual se realiza para evitar la presencia de cuerpos extraños en la muestra de semen colectada (Serres, 2012).

Luego de haber obtenido cada muestra seminal, estas fueron filtradas mediante el uso de filtros estériles de nylon, con el fin de separar la fracción gel de la fracción rica en espermatozoides (Varner, 2008). Posteriormente, se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas. Para la medición del volumen se utilizaron Beakers esterilizados, el pH fue evaluado mediante tiras reactivas (Merck®), la movilidad espermática se evaluó mediante el uso de un microscopio con objetivo a 10X, la concentración espermática fue determinada mediante el uso de cámara de Neubauer, y la integridad funcional de la membrana espermática a través del uso de HOST.

Procesamiento y refrigeración del semen

Luego de haberse diluído cada muestra seminal, estas fueron divididas en tres grupos (0, 24 y 48 horas) y colocadas en un Whirl-Pak correctamente sellado. Las muestras del primer grupo fueron evaluadas inmediatamente después de ser diluídas y centrifugadas a 400 gauss (g) durante 8 minutos, sin ser sometido a refrigeración, es decir, semen fresco y diluído, el segundo grupo fue sometido a refrigeración a 5°C dentro de un Equitainer (Usuga et al, 2016; Boeta y Zarco, 1999) durante 24 horas, y el tercer grupo fue almacenado de la misma manera que el segundo, pero durante 48 horas.

Análisis de laboratorio del semen fresco y refrigerado

Para determinar la concentración espermática, se realizó una dilución de la muestra de semen con agua destilada a una relación 1:20, es decir, 1 gota de semen con 20 gotas de agua destilada. Posteriormente, se colocó 1 gota de la dilución sobre la cámara de Neubauer y se llevó a cabo el recuento mediante un microscopio a 400X. Con respecto a la motilidad espermática, se evaluó el semen fresco sin diluir, semen fresco diluído y semen diluído refrigerado a las 24 y 48 horas, la proporción eyaculado - dilutor Equiplus® a 37°C (Alamaary, 2019, Usuga et al, 2016), osciló entre 1:1 a 1:5, lo cual dependió de la

concentración de cada muestra, se colocó 20 μL de semen en una lámina portaobjetos y se observó a través de un microscopio a 10X.

Para la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática, se preparó la solución hipoosmótica, que contiene 7.35 g de Dihidrato de Citrato de Sodio y 13.51 g de Fructosa en 1 L de agua destilada.

A cada grupo de análisis (0, 24 y 48 horas de refrigeración) de muestras seminales previamente diluídas, se les extrajo 1 ml, de igual forma se extrajo 9 ml de Phosphate Buffered Saline (PBS), ambos fueron colocados y homogenizados en un tubo Falcon de 15 ml. Posteriormente, se realizó la centrifugación, con el fin de separar sedimentos sólidos de líquidos, se retiró el sobrenadante y dentro de un tubo Eppendorf se colocó 50 μL del sedimento sólido obtenido y 1 ml de HOST, para su posterior incubación en una estufa a 37-38 °C durante 1 hora (Neild et al., 1999; Nie & Wenzel, 2001). Luego se tomó 20 μL de la muestra incubada, colocándose en una lámina portaobjetos, donde se realizó un frotis. Seguidamente se realizó el análisis, mediante un microscopio a 40X, evaluándose 5 campos diferentes para obtener el porcentaje total de espermatozoides con reacción positiva, donde se observa una hinchazón de la parte distal de la cola (Figura 1: A - F) (Neild et al, 1999; Jeyendran et al, 1984; Bredderman y Foote, 1969), reacción producida debido a que la membrana celular en la región de la cola presenta mayor sensibilidad, probablemente a causa de una menor adhesión con las estructuras internas como las que se encuentran en la cabeza y/o una mayor cantidad de agua introducida en la cola (Vásquez et al., 2012). Por el contrario, aquellos espermatozoides que se observan sin ninguna alteración en la cola (Figura 1: NS - no specified) son considerados con daño funcional de la membrana espermática (Neild et al., 1999).

Análisis estadístico

Para conocer el efecto del tiempo de refrigeración (0, 24 y 48 horas) sobre el porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de membrana se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un nivel de significancia del 5%, seguida del test de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Asimismo, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para determinar si la integridad funcional de membrana sigue la distribución normal, con un nivel de significancia del 5%. Estos análisis fueron ejecutados con ayuda del programa Prism®version 3.0.

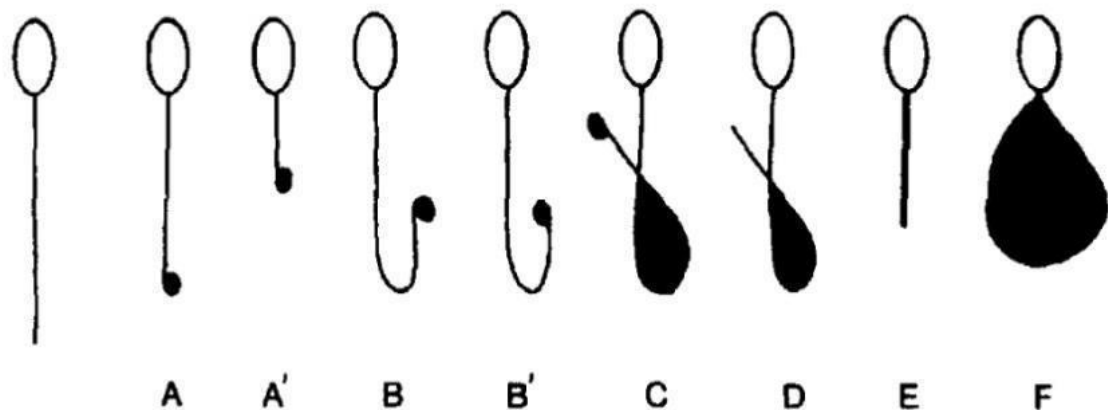


Figura 1. No Specified (NS): Espermatozoide sin hinchazón; A- F: Distintos tipos de cambios morfológicos típicos de la hinchazón observada en la cola de espermatozoides equinos, se observa hinchazón en la cola (área negra), las primas indican variaciones. Tomado de Hypoosmotic Test in equine spermatozoa, por Neild et al., (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran por primera vez un efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de membrana de espermatozoides equinos de la línea Zangersheide durante las primeras 48 horas post refrigeración. Mediante ANOVA se determinó que el porcentaje de espermatozoides reaccionados en el Test Hipoosmótico presentó una diferencia significativa ($p < 0.0001$). En la prueba de comparación de medias (Test de Tukey) se encontró, con respecto a la integridad de membrana espermática inicial, que a las 24 horas de refrigeración presentó una disminución considerable respecto al inicial, ($p < 0.001$). A las 48 horas de refrigeración presenta una disminución significativa respecto a la inicial ($p < 0.001$). Lo mismo sucede cuando se realiza una comparación entre los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas de refrigeración, donde también existe una disminución significativa ($p < 0.001$).

Al analizar los resultados obtenidos al realizar el HOST a las 0 horas de refrigeración, estos dieron un promedio de espermatozoides con reacción positiva, que se encuentran dentro de lo esperado según lo reportado para padrillos aptos para su reproducción (Cuadro 1). Resultados similares se pueden encontrar en otros estudios donde realizaron la misma técnica. Pugliesi et al., (2012), realizaron el test hipoosmótico con semen de tres caballos Mangalarga Marchador, diluídos con dos dilutores diferentes (Kenney y Foote), obteniendo un porcentaje de reacción positiva en semen sin refrigerar igual a $57 \pm 15.7\%$ y $59.2 \pm 13.3\%$ diluídos con Kenney y Foote, respectivamente. Asimismo, Alamaary et al., (2019), obtuvieron un porcentaje de HOST igual a $61.05 \pm 0.25\%$ utilizando Equiplus como dilutor en semen de tres caballos árabes, a diferencia de nuestro estudio, este resultado fue obtenido luego de 90 minutos de refrigeración, lo cual explica la ligera diferencia que existe entre ambos estudios.

Sin embargo, un estudio realizado por Giraldo et al., (2006), donde al realizar HOST, en semen de cinco caballos Criollos Colombianos, obtuvieron un porcentaje de reacción positiva igual a $32.7 \pm 5.9\%$, siendo menor a lo obtenido y reportado por el estudio que realizaron Pugliesi et al., (2012), pese a que se usó el mismo diluyente Kenney, esto puede deberse a la distancia y por ende el tiempo que existe entre el lugar de colecta y el laboratorio, lo cual aumenta el tiempo en que el semen está expuesto

a diferentes estímulos ambientales que afectan su viabilidad. Contrariamente, Rubio et al., (2009), obtuvieron un total de $71.85 \pm 3.51\%$ de espermatozoides con reacción positiva, resultado obtenido al realizar HOST en semen fresco de cuatro toros adultos, pese a ser especies diferentes se tuvo en cuenta el intervalo de tiempo entre colectas, para evitar el agotamiento en los padrillos y por ende características espermáticas alteradas.

Por otro lado, al realizar el HOST a las 24 horas de refrigeración (Cuadro 1) se obtuvo un promedio que se encuentra dentro de los valores de integridad funcional de membrana espermática útil para la inseminación artificial. Un estudio realizado por Ali et al., (2018), demostró que al utilizar goma arábica (GA) al 3% como diluyente en semen de tres caballos árabes, se obtiene un $34.25 \pm 9.38\%$ de espermatozoides con reacción positiva en HOST, mientras que al usar GA al 15 %, se obtuvieron un porcentaje de HOST igual a $24.7 \pm 8.0\%$, lo cual indica que al usar la GA a esa concentración tiene efectos perjudiciales en las características espermáticas. Asimismo, Giraldo et al., (2006) reportó un aumento del porcentaje de espermatozoides con reacción positiva, refrigerados a 5°C durante 24 horas, con respecto al porcentaje obtenido con semen fresco, dando un total de $34.7 \pm 7.8\%$, atribuyen que el aumento fue por la adición del dilutor Kenney y el correcto almacenamiento; sin embargo, lo tomaron como no significativo al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0.05$). Resultados similares se obtuvieron en el estudio realizado por Pugliesi et al., (2012) dando un total de $39.9 \pm 14.0\%$ de espermatozoides con reacción positiva, diluïdos con Foote, mientras que al ser diluïdos con Kenney se obtuvo un total de $23.6 \pm 11.3\%$ espermatozoides con reacción positiva. La diferencia entre los resultados obtenidos por nuestro estudio en comparación con Pugliesi et al. podría deberse al intervalo de tiempo que tuvieron entre colectas, ya que Pugliesi et al., (2012) indican que las colectas fueron realizadas con intervalos de 1 día, lo cual según Parrish (2018) menciona que eyaculaciones consecutivas disminuyen el número de espermatozoides obtenidos por colecta y por ende se verán afectadas las características espermáticas, contrariamente al estudio de Pugliesi et al., (2012), las colectas que se realizaron en nuestro estudio tuvieron un intervalo de cuatro días con la finalidad de evitar alteraciones en las características de los espermatozoides obtenidos en cada eyaculado.

Con respecto al HOST realizado a cada muestra a las 48 horas (Cuadro 1), se obtuvieron porcentajes no adecuados para usar en una inseminación artificial con semen refrigerado exitosa, ya que autores como Giraldo et al., (2006), mencionan que las características ideales para que una inseminación acabe en gestación disminuyen a través del efecto de refrigeración, ya que se da un gran impacto sobre la funcionalidad del espermatozoide para que sea fecundante, a diferencia de nuestro resultado, en su estudio obtuvieron $14.36 \pm 13.5\%$ de espermatozoides reaccionados en HOST, la diferencia podría deberse al tipo de diluyente usado.

Como se ha podido observar en los diferentes estudios anteriormente mencionados, donde se utilizaron diferentes razas equinas, tales como Caballo Criollo Colombiano, Mangalarga Marchador y Árabes, podemos comparar dichos resultados con los obtenidos por nuestro estudio, donde utilizamos a la línea Zangersheide, con ello se pudo demostrar que existe variabilidad entre razas - líneas al evaluar la integridad funcional de la membrana espermática. Como podemos observar en semen fresco se obtuvieron resultados similares entre la línea Zangersheide, Mangalarga Marchador y Árabes, siendo nuestra línea de estudio la de mayor porcentaje de reacción positiva. Por el contrario, al comparar nuestros resultados con la raza de Caballos Criollos Colombianos, ésta tuvo un porcentaje menor de espermatozoides con reacción positiva al realizar HOST.

Los espermatozoides evaluados a las 24 horas de refrigeración tuvieron una reacción positiva superior en la línea Zangersheide en comparación al resto de razas estudiadas. De la misma manera sucede al obtener los resultados de la evaluación a las 48 horas, lo que indica que los espermatozoides de la línea de nuestro estudio presentan una mayor resistencia y mantienen su funcionalidad.

El semen de la especie equina puede mantener características ideales para la inseminación artificial, bajo refrigeración a 5°C de temperatura, siendo posible utilizarlo como máximo a las 24 horas de refrigeración (Giraldo et al, 2006), ya que se ha demostrado que a mayor tiempo de refrigeración existen mayores alteraciones en la funcionalidad de la membrana del espermatozoide, así pues podría darse una inseminación artificial exitosa que concluya en una gestación.

Cuadro 1. Estadística descriptiva de los resultados de porcentajes de integridad funcional de la membrana espermática a las 0, 24 y 48 horas.

	0 horas	24 horas	48 horas
Promedio de integridad funcional de la membrana espermática (%)	70 ^a	55.2 ^b	38.2 ^c
Desviación estándar	5.64	5.55	6.56
Mínimo (%)	59	45	28
Máximo (%)	77	63	52

Valores obtenidos en base a las quince muestras seminales de tres padrillos evaluadas a las 0, 24 y 48 horas.

^{a,b,c}: Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que existe efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de la membrana espermática en muestras seminales de la línea Zangersheide refrigeradas a 5°C, produciéndose una disminución gradual de la integridad funcional de la membrana espermática durante las primeras 48 horas, es decir, se obtuvieron mayor porcentaje de membranas espermáticas funcionales a las 0 horas en comparación a las 24 horas, de la misma manera sucede si se compara entre las 24 y 48 horas.

LITERATURA CITADA

1. Alamaary MS, et al. 2019. Effects of four extenders on the quality of frozen semen in Arabian stallions. *Vet. World*. 12 (1): 34-40.
2. Ali M, et al. 2018. Effect of gum arabic on stallion sperm survival during cold storage and post freezing. *Mac. Vet. Rev.* 41 (1): 21-31.
3. Alonso A, et al. 2016. Uso de semen congelado en programas de inseminación artificial en equinos. *SPERMOVA*. 2: 107-109.
4. Alvarenga MA, et al. 2003. The use of alternative cryoprotectants for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation*. 12 (2): 74-76.
5. Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7: 145-173.
6. Boeta M, Zarco L. 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Vet. Mex.* 31 (1): 67-69.
7. Bredderman PJ, Foote RH. 1969. Volume of Stressed Bull Spermatozoa and Protoplasmic Droplets, and the Relationship of Cell Size to Motility and Fertility. *Ani. Sci. J.* 28 (4): 496-501.
8. Canisso, et al. 2008. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev. investig. vet. Perú.* 19 (2): 113-125.
9. Drevious LO, Eriksson H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 42 (1): 136-156.
10. Giraldo S, et al. 2006. Evaluación del efecto de la refrigeración Sobre la calidad del semen equino. *Ces. Med. Vet.* 1 (2): 8-16.
11. Hammerstedt RH, et al. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl* 11: 73-88.
12. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. 2009. Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiol. Rev.* 89 (1): 193-277.

13. Jeyendran, R. S. et al. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70 (1): 219-228.
14. Katila T. 2001. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Vet. Scand.* 42: 199.
15. Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68 (3-4): 191-200.
16. Love C. 2012. Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *J. Equine Vet. Sci.* 32 (8): 464-466.
17. Neild D, et al. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology.* 51 (4): 721-727.
18. Nie GJ, Wenzel JGW. 2001. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology.* 55 (4): 1005-1018.
19. Parrish J. 2018. Sexual behavior and performance of the stallion. Department of Animal Science, University of Wisconsin-Madison. Reading 9.
20. Pugliesi G, et al. 2012. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *R. Bras. Zootec.* 41 (12): 2411-2417.
21. Rubio JL, et al. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cientif.* 10 (4): 382-389.
22. Sánchez R, Gómez I, Samper J. 2009. Artificial Insemination with Frozen Semen. In: Saunders WB, eds. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination.* 2nd ed. Canada. p 175-183.
23. Seminario JM. 2020. Efecto citotóxico del ácido hipocloroso en espermatozoides de caballo equus caballus. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Ricardo Palma. 43 p.
24. Serres C. 2012. Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. En: I Congreso Solidario de Clínica Equina. Madrid: Revista Complutense de Revistas Veterinarias.
25. Usuga A, et al. 2016. Criotolerancia del semen equino, estabilidad oxidativa y componentes del plasma seminal. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 27 (3): 505-517
26. Varner DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology.* 70 (3): 448-462.

27. Vásquez J, Florentini EA, Valdivia M. 2012. Hypoosmotic Swelling Test in Alpaca (*Vicugna pacos*) Epididymal Spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 47 (6): e83-e87.
28. Vidament M, et al. 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology.* 48 (6): 907-917.
29. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
30. Zeidan AEB, et al. 2018. Assessment of The Functional Integrity of Equine Spermatozoal Membrane Using Hypo-Osmotic Swelling Test. *Suez Canal Vet. Med. J.* 23 (2): 157-168.

Anexos:

Anexo 1: Evidencia del envío a revista científica

Publicación de artículo




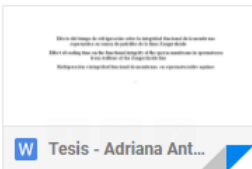
Adriana Antonell Espinoza Girón <aaeg.21@gmail.com>
para rivep@unmsm.edu.pe ▾

 14:58 (hace 35 minutos)



Buenas tardes, mediante el presente correo envío mi artículo de investigación como solicitud de publicación para su revista. Quedo atenta a cualquier disposición, gracias.
Saludos cordiales,
Adriana Espinoza.

 Libre de virus. www.avast.com



Anexo 2: instrumentos usados en la investigación

Material	Unidad de medida	Cantidad
Camisas sanitarias	Unidad	18
Pipeta automática de 100 μ L	unidad	2
Whirl Pak	Unidad	33
Cinta adhesiva	unidad	1
Gel lubricante no espermicida	Galón	1
Gel ecográfico	Galón	1
Filtros de nylon	Unidad	15
Tubos centrífuga Falcon® 50 ml	Unidad	15
Tubos centrífuga Falcon® 15 ml	unidad	45
Tubos de ensayo	Unidad	3
Dilutor “Equiplus”	Sobre para 1L	1
HOST en Tubos Eppendorf (1ml)	Unidad	45
PBS solución	Pastilla	1
Láminas portaobjetos	Caja x 100 unidades	1
Láminas cubreobjetos	Caja. x 100 unidades	1
Láminas cubre cámara	Caja. x 100 unidades	1
Biker de 250ml	Unidad	3
Agua estéril para inyección	Litro	1
Tiras de pH	Caja. x 100 unidades	1
Tips de 100 μ L	Paquete x 1000 unidades	1
Pipetas Pasteur de 2ml	Paquete x 100 unidades	1
Algodón	Rollo de 500 gr	5
Papel toalla	Rollo	5
Guantes de nitrilo	Caja. x 100 unidades	3
Guantes de palpación	Caja. x 100 unidades	1
Vagina artificial modelo Missouri	Unidad	1

Equipos

- 1 Baño termostático Memmert
- 1 Estufa Memmert
- 1 Microscopio binocular 3S científico USA – YJ-2016TLCD
- 1 Equitainer
- 1 Refrigeradora – congelador
- 1 Platina térmica
- 1 Cámara de Neubauer MARIENFELD GERMANY
- 1 Centrífuga 3S científico USA
- 1 Ecógrafo SonoScape S6v
- 1 Hervidor Thomas
- 1 Laptop HP 1000 Notebook PC
- 1 impresora HP DeskJet 5820