

Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino

Use of a medium with soy lecithin for freezing equine semen

CALDEVILLA, M.^{1,2,3}; FERRANTE, A.^{1,2,3}; NEILD, D.^{1,2,3}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). ³Cátedra de Teriogenología. Buenos Aires. Argentina. .

RESUMEN

La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de semen, presenta como limitantes ser un compuesto de origen animal y un potencial riesgo de contaminación. Debe ser procesada al momento de su utilización y al poseer gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, interfiere con la evaluación del semen. El objetivo de este trabajo fue probar si el medio AndroMed®, a base de lecitina de soja, es efectivo para congelar semen equino. Los eyaculados se diluyeron con: 1) yema de huevo y dimetilformamida; 2) yema de huevo, dimetilformamida y glicerol; 3) AndroMed®; 4) AndroMed® suplementado con dimetilformamida. Se evaluaron los parámetros cinemáticos, la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides posdescongelado. La movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. De igual manera los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. Como conclusión, en las condiciones experimentales descritas, el diluyente AndroMed® no evidenció ventajas cuantitativas comparado con otro diluyente convencional respecto a la capacidad de congelar semen equino con parámetros mínimos de aceptación *in vitro*.

Palabras clave: (congelamiento), (yema de huevo), (dimetilformamida), (glicerol), (AndroMed®).

ABSTRACT

Egg yolk, used routinely in numerous semen freezing protocols, has the limitation of being a compound of animal origin and thus a potential risk of contamination. It must be processed at the time of its use and as it has granules similar in size to sperm, it interferes with the evaluation of semen. The objective of this study was to evaluate if AndroMed®, a medium based on soybean lecithin, can be used successfully to freeze equine semen. The ejaculates were diluted with: 1) egg yolk and dimethylformamide; 2) egg yolk, dimethylformamide and glycerol; 3) AndroMed®; 4) AndroMed® with dimethylformamide. The kinematic parameters, viability and acrosome status of post-thaw spermatozoa were evaluated. Total and progressive motility were significantly higher ($p < 0.05$) in media with egg yolk when compared to AndroMed®. In addition, media with egg yolk showed significantly higher percentages of live sperm with intact acrosomes than those with AndroMed® ($p < 0.05$). In conclusion, under the described experimental conditions, the AndroMed® diluent did not show any quantitative advantages over a conventional diluent with regard to its ability to freeze equine semen with minimal parameters of *in vitro* acceptability.

Key words: (freezing), (egg yolk), (dimethylformamide), (glycerol), (AndroMed®).

INTRODUCCIÓN

Los diluyentes para congelamiento de semen equino suelen contener medios base que aportan sustrato energético, compuestos tampones (buffers), antibióticos y agentes crioprotectores. La elección adecuada del diluyente es crucial para el éxito de la criopreservación de semen en cualquier especie. La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de diversas especies, presenta algunas limitantes en su uso. En primer lugar, al ser un compuesto de origen animal, representa un potencial riesgo de contaminación de las dosis inseminantes, pudiendo entonces participar en la transmisión de enfermedades⁵. Es por ello que existen reglamentaciones internacionales que restringen el ingreso de productos que contengan huevo o derivados del mismo, viéndose limitadas las posibilidades de comercialización de semen congelado. Por otro lado, la yema de huevo es poco práctica para usar, ya que debe ser procesada al momento de su utilización y además porque, al tener en su composición gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, en muchos casos interfiere con la observación microscópica y con ensayos bioquímicos incluidos en la evaluación del semen⁷. Por último, no es un producto estandarizado ya que depende de factores como la

dieta y el manejo de las gallinas que producen los huevos⁸. La soja contiene lecitina, una fracción de fosfolípidos que podría sustituir a las lipoproteínas de alto peso molecular y los fosfolípidos de la yema de huevo y prevenir el daño de la membrana plasmática del espermatozoide que se produce durante el enfriamiento y la criopreservación⁷. Los diluyentes a base de lecitina de soja se han evaluado para procesar y congelar el semen bovino, como una alternativa aceptable a la yema de huevo tradicional y a los diluyentes a base de leche para la criopreservación de semen de toro⁷. Estudios realizados comprobaron la efectividad del AndroMed®, un medio libre de proteínas de origen animal a base de lecitina de soja, para congelar semen de toros, obteniendo mejores tasas de no-retorno en la inseminación artificial que con semen diluido y congelado en un medio a base de TRIS y yema de huevo¹. Este medio permitió además una adecuada visualización de los diferentes parámetros espermáticos evaluados, no interfiriendo con las tinciones aplicadas a tal fin. Una modificación del AndroMed® fue desarrollado para refrigerar semen equino, el AndroMed-E (Minitüb, Alemania), y su efectividad fue comparado al de otros dos diluyentes de composición proteica definida: el EquiPro y el EquiPro TM³. En ese estudio, el semen fue refrigerado

a 5 °C durante 4 días, observando que la movilidad progresiva, la velocidad y la viabilidad espermáticas disminuyeron notablemente con el AndroMed-E. Hasta el momento solo dos grupos de investigadores^{13,17} han reportado el uso de lecitina de soja, en reemplazo de la yema de huevo en dos diluyentes comerciales para congelar semen equino. No encontraron diferencias en los parámetros evaluados *in vitro* (movilidad total y progresiva y la integridad de membrana) del semen equino pos-descongelado comparando diluyentes con yema de huevo o con lecitina de soja, sin embargo los resultados de fertilidad fueron significativamente menores en ambos trabajos cuando se inseminó con semen criopreservado con lecitina de soja. El objetivo del presente trabajo fue probar si el medio de congelamiento AndroMed®, que es un diluyente comercial para congelar semen bovino a base de lecitina de soja, puede emplearse y es efectivo para congelar semen equino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y evaluación de rutina del semen

El presente estudio cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (Aprobación N° 2016/3).

El semen se recolectó utilizando una vagina artificial modelo Missouri y un súcubo natural. Los eyaculados se evaluaron macro y microscópicamente previo al procesamiento. Se recolectó semen de 6 padrillos (n=6, r=3), 5 padrillos alojados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires y 1 padrillo de un establecimiento privado. Todos eran padrillos de fertilidad probada, 3 de raza criolla, 1 Cuarto de milla y 2 Silla Argentino, entre 5 y 15 años de edad, en condiciones de D.S.O. (Daily Sperm Output) al momento de la colecta de semen. La movilidad espermática del semen fresco se evaluó de manera subjetiva por observación directa sobre platina termostatiza-

da (37 °C) y la concentración espermática se evaluó mediante hemocitometría utilizando una cámara de Neubauer. Cada eyaculado se diluyó volumen: volumen en medio a base de leche descremada (diluyente de Kenney: 2,4 gr de leche descremada, 4,9 gr de glucosa, antibiótico 1 gr de ticarcilina, 100 ml agua destilada estéril), se dividió en 4 alícuotas, se centrifugó 15 minutos a 800 g, se aspiró el sobrenadante y el pellet fue rediluido a una concentración de 300 millones de espermatozoides/ml con los siguientes diluyentes: 1) diluyente base (50 % de lactosa al 11 %, 25 % EDTA-glucosa, 0,5 % Equex, 20% de yema de huevo) con 5% de dimetilformamida (DMF); 2) diluyente base con 2,5% de DMF y 2,5% de glicerol; 3) diluyente comercial para semen bovino: AndroMed® (Minitüb, Alemania) que contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, buffers, glicerol, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) ; 4) diluyente comercial para semen bovino AndroMed® (Minitüb, Alemania) suplementado con 2,5% de DMF. El congelamiento se realizó de acuerdo a un protocolo usado para semen equino en 2001^{6,10,11}. El semen diluido se equilibró 30 minutos a temperatura ambiente (22 a 26 °C), luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml. Las pajuelas fueron colocadas en gobeletes plásticos y sumergidos en una mezcla de etanol-acetona 1:1 dentro de un canastillo de bronce. Brevemente, el canastillo fue mantenido dentro del termo de nitrógeno (de 10 litros) a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, controlando el descenso de la temperatura con un termómetro digital desde temperatura ambiente hasta - 15 °C (descenso de 10-12 °C/minuto). Luego se llevó el canastillo hasta el nivel del nitrógeno líquido, hasta alcanzar los - 120 °C (descenso de 25 a 40 °C/minuto), se sacaron las pajuelas de la mezcla de etanol-acetona y finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido, a - 196 °C. El descongelamiento se realizó en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto.

Evaluación de los parámetros cinemáticos

Se evaluaron los parámetros cinemáticos utilizando un sistema computarizado (CASA: Computer Assisted Semen Analysis), el Andro-Vision® (Minitüb, Alemania). En cada muestra se analizaron los valores cinemáticos de al menos 1000 espermatozoides totales y se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles totales y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva. Se analizaron los siguientes parámetros cinemáticos: velocidad curvilínea (VCL: velocidad media de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad en línea recta (VSL: velocidad media medida en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad de trayectoria media (VAP: distancia promedio que el espermatozoide ha atravesado durante el período de análisis; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, amplitud de las oscilaciones de la cabeza del espermatozoide; expresada en μm), frecuencia de bateo espermático (BCF: frecuencia con que la cabeza atraviesa la trayectoria del espermatozoide; expresada en Hertz), índice de oscilación (WOB, expresado en %) rectitud (STR, expresada en %; $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) y linealidad (LIN, expresada en %; $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$).

Evaluación de viabilidad espermática e integridad acrosomal

Se evaluó la capacitación midiendo la capacidad de los espermatozoides de llevar a cabo la reacción acrosomal. Para evaluar el estado del acrosoma se empleó la tinción con la lectina de la aglutinina del maní marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA)¹⁴ junto con el colorante fluorescente Ioduro de Propidio (PI) para detectar los espermatozoides muertos. Brevemente, las muestras de semen se tiñeron con Ioduro de Propidio y FITC-PNA incubándolos durante 10 minutos a 37 °C. Los patrones de reacción acrosomal se observaron con microscopía de epifluorescencia entre porta y cubreobjetos a 1000x. En espermatozoides

que no han realizado la reacción acrosomal, los acrosomas permanecen sin teñir, mientras que en los espermatozoides reaccionados, la lectina se une selectivamente a la membrana acrosomal externa y los acrosomas se tiñen de verde emitiendo señal fluorescente. El Ioduro de Propidio es un colorante específico de ADN que no puede penetrar si la membrana citoplasmática está intacta, penetrando solamente en las células que han perdido la integridad de la membrana, por lo tanto tiñe el núcleo de los espermatozoides muertos de color rojo.

Análisis estadístico

Para analizar los parámetros cinemáticos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) del índice de oscilación y la rectitud, mientras que, al no demostrar una distribución normal, se realizó un análisis de Friedman para la movilidad total y progresiva, velocidad curvilínea, velocidad en línea recta, velocidad de trayectoria media, frecuencia de bateo espermático, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y la linealidad.

Dentro de los patrones de FITC-PNA/PI, fueron analizados mediante un ANOVA el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado, mientras que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado y el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, al no demostrar una distribución normal, fueron analizados utilizando el test de Friedman.

En todos los casos se bloqueó por padrillo. Los datos se expresan en valores medios \pm desvío estándar (DS), y se consideró un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Parámetros cinemáticos del semen descongelado

En las muestras de semen equino pos-descongelado la movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo

respecto los dos de AndroMed® (Figura 1).

Los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, ALH, BCF fueron significativamente mayores en los dos diluyentes que contenían yema de huevo con respecto al diluyente AndroMed® ($p < 0,05$). Sin embargo no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los parámetros cinéticos de LIN, STR y WOB entre los diferentes diluyentes utilizados (Tabla 1).

El uso del diluyente AndroMed® mejoró sensiblemente la visualización de los espermatozoides en el AndroVision® (sistema CASA utilizado en este estudio), como puede observarse en la Figura 2.

Viabilidad espermática e integridad acrosomal

En las muestras de semen pos-descongelado los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto a los dos de AndroMed®. Mientras

que los porcentajes de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento AndroMed® con respecto a los de yema de huevo.

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto luego de ser congelados-descongelados en los diferentes medios ensayados (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los componentes básicos de los diluyentes para criopreservación de semen equino son los mismos desde hace 35 años, y en la mayoría de los protocolos incluyen yema de huevo, un crioprotector permeable, un azúcar y sustancias detergentes^{7, 9, 19}. La yema de huevo y la leche, compuestos de origen animal, se incluyen de forma rutinaria en protocolos de criopreservación para semen de animales domésticos y su función radica en proteger a la célula del shock por frío⁶. Se ha reportado que el daño producido por el congelamiento-descongelamiento

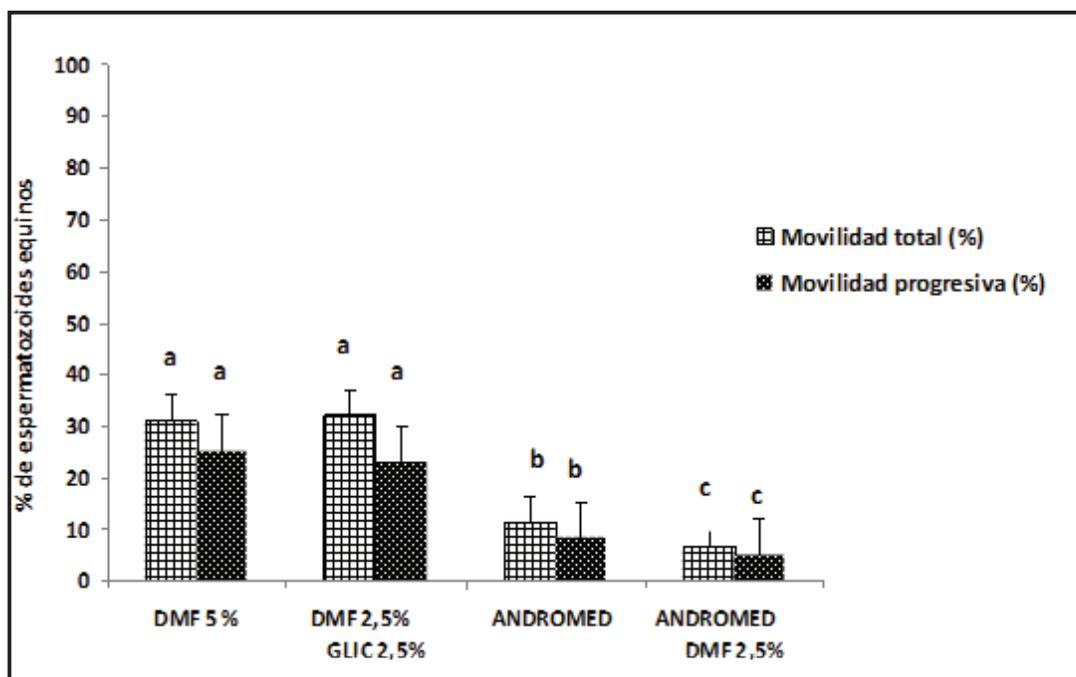


Figura 1. Evaluación de la movilidad total y progresiva de espermatozoides equinos pos-descongelado, utilizando un sistema computarizado de análisis de semen AndroVision® (Minitüb, Alemania).

^{a, b} letras diferentes indican diferencias significativas entre los diluyentes en la movilidad total y progresiva ($p < 0,05$).

Tabla 1. Evaluación mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA; AndroVision®, Minitüb, Alemania) de los parámetros cinemáticos del semen equino pos-descongelado. Los datos son porcentajes promedio \pm DS.

| MEDIOS | VCL [$\mu\text{m/s}$] | VSL [$\mu\text{m/s}$] | VAP [$\mu\text{m/s}$] | BCF [Hz] | ALH [μm] | LIN | STR | WOB |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Yema-DMF 5 % | 36 \pm 20 ^a | 11 \pm 8 ^a | 16 \pm 9 ^a | 5,4 \pm 5 ^a | 0,6 \pm 0,3 ^a | 0,32 \pm 0,2 ^a | 0,6 \pm 0,2 ^a | 0,5 \pm 0,1 ^a |
| Yema-DMF 2,5% -GLIC 2,5% | 31 \pm 20 ^a | 11 \pm 10 ^a | 15 \pm 11 ^a | 4,7 \pm 3,6 ^a | 0,5 \pm 0,3 ^a | 0,31 \pm 0,1 ^a | 0,7 \pm 0,1 ^a | 0,5 \pm 0,1 ^a |
| ANDROMED® | 17 \pm 11 ^b | 8 \pm 7 ^b | 10 \pm 8 ^b | 1,5 \pm 1 ^b | 0,3 \pm 0,2 ^b | 0,4 \pm 0,2 ^a | 0,7 \pm 0,2 ^a | 0,5 \pm 0,1 ^a |
| ANDROMED®- DMF 2,5% | 14 \pm 10 ^b | 6 \pm 5 ^b | 8 \pm 7 ^b | 2 \pm 1 ^b | 0,2 \pm 0,2 ^b | 0,5 \pm 0,3 ^a | 0,8 \pm 0,2 ^a | 0,6 \pm 0,2 ^a |

^{a,b} letras diferentes indican diferencias significativas entre medios para cada parámetro cinemático ($p < 0,05$).

DMF: dimetilformamida

GLIC: glicerol

ALH amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm)

BCF: frecuencia de bateo espermático (Hertz)

LIN: linealidad (%)

STR: rectitud (%)

VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/seg}$)

VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/seg}$)

VAP: velocidad de trayectoria media ($\mu\text{m/seg}$),

WOB: índice de oscilación (%)

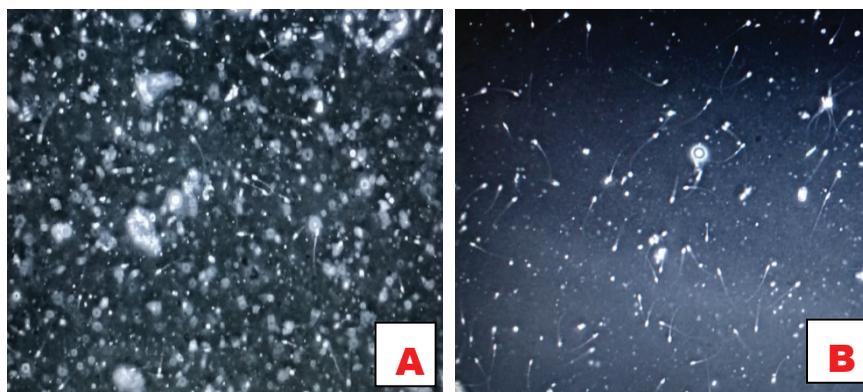


Figura 2. Visualización de los espermatozoides equinos pos-descongelados evaluados con el sistema computarizado de análisis de semen AndroVision® (Minitüb, Alemania). A: es la imagen del CASA con un diluyente que contiene yema de huevo, B: es la imagen del CASA con Andromed®.

Tabla 2. Estado del acrosoma y viabilidad espermática, evaluados con la tinción FITC-PNA/PI, en semen equino congelado-descongelado con diferentes diluyentes. Los datos son porcentajes promedio \pm DS.

| MEDIOS | PNA- / PI- (%) | PNA+ / PI- (%) | PNA- / PI+ (%) | PNA+ / PI+ (%) |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| YEMA 20 %- DMF 5 % | 44 \pm 9 ^a | 4 \pm 2 ^a | 14 \pm 5 ^a | 38 \pm 10 ^a |
| YEMA 20 %-DMF 2,5 % - GLIC 2,5% | 37 \pm 8 ^b | 4 \pm 2 ^a | 16 \pm 7 ^a | 43 \pm 8 ^a |
| ANDROMED® | 13 \pm 6 ^c | 2 \pm 1 ^b | 11 \pm 4 ^a | 74 \pm 9 ^b |
| ANDROMED® - DMF 2,5% | 13 \pm 6 ^c | 1 \pm 1 ^b | 12 \pm 4 ^a | 74 \pm 8 ^b |

PNA-/PI-: Espermatozoide vivo con acrosoma intacto.

PNA+/PI-: Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado.

PNA-/PI+: Espermatozoide muerto con acrosoma intacto.

PNA+/PI+: Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado.

^{a,b} letras diferentes indican diferencias significativas entre medios para cada patrón de FITC-PNA/PI ($p < 0,05$).

puede ser disminuido por la adición de las lipoproteínas presentes en la yema de huevo, que actuarían protegiendo al espermatozoide del shock por frío y estabilizando la membrana espermática^{20, 21}. Con el objetivo de establecer una alternativa que reemplace a la yema de huevo se ha demostrado que el plasma de yema de huevo esterilizado tiene el potencial de reemplazar la yema de huevo en el diluyente de congelación de semen equino ya que los parámetros de movilidad no fueron significativamente diferentes entre los diluyentes, aunque la integridad de la membrana se conservó mejor en el semen congelado con yema de huevo. Sin embargo se obtuvieron los mismos resultados en los índices de preñez¹⁵. En un trabajo posterior, estos mismos autores evaluaron la capacidad crioprotectora del agregado de liposomas, compuestos de los fosfolípidos de la yema de huevo, al diluyente para congelar semen equino¹⁶. Si bien encontraron que los liposomas fueron efectivos en proteger a los espermatozoides, los resultados no mejoraron los obtenidos con yema de huevo y concluyeron que aún se requiere optimizar la composición de los liposomas a ser utilizados para reemplazar eficientemente a la yema de huevo. En un estudio reciente se demostró que el reemplazo de la yema de huevo con un

complejo de Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPBCD) y colesterol en el diluyente para criopreservar semen mejoró la movilidad total, progresiva y la viabilidad del semen equino pos-descongelado⁴. Otros autores han sugerido que se podría utilizar goma arábica precalentada como un crioprotector alternativo para la crioconservación de semen equino, ya que mantuvo la movilidad total de los espermatozoides en 46-50%, elevó la movilidad progresiva en 27% y obtuvo los mismos porcentajes de preñez que el control con yema de huevo². Por otro lado para congelar semen equino un grupo de investigadores en Brasil reemplazaron la yema de huevo en el diluyente comercial Botu-Crio® (Botupharma, Brasil) por diferentes concentraciones de lecitina de soja. *In vitro*, ambos diluyentes mostraron porcentajes similares de movilidad total, progresiva y de membranas intactas. Sin embargo, los mejores resultados de fertilidad luego de la inseminación artificial se obtuvieron con el semen congelado con Botu-Crio®¹³. Por lo tanto, aunque los resultados de laboratorio (*in vitro*) fueron similares, se obtuvieron menores tasas de preñez utilizando semen congelado con lecitina de soja. Si contrastamos estos resultados con los del presente estudio con AndroMed®, los pará-

metros seminales *in vitro* no fueron similares ya que la movilidad total y progresiva disminuyeron significativamente en el presente estudio y además aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado cuando se congeló con el diluyente AndroMed® sin yema. Las diferencias entre este estudio y el trabajo citado anteriormente¹³ podrían deberse a las distintas concentraciones de lecitina de soja presentes en el medio de congelamiento, como así también diferencias en los componentes de los diluyentes comerciales AndroMed® y Botu-Crio®. El mismo grupo de investigación evaluó si se produciría una asociación entre los lípidos de la lecitina de soja con los lípidos de la yema de huevo para mejorar la protección de las membranas de los espermatozoides de padrillos “malos congeladores” agregando lecitina de soja al diluyente comercial Botu-Crio¹⁸. Sin embargo, si bien esta modificación no dio diferencias significativas con el control, no proporcionó un aumento en los parámetros cinemáticos ni en la integridad de la membrana espermática evaluados en el semen equino pos-descongelado, y tampoco incrementó la tasa de preñez pos-inseminación artificial¹⁸. En otro estudio¹² se evaluó si se producía un efecto protector sinérgico entre un 2% o un 4% de yema de huevo centrifugada y 1,25% de lecitina de soja, ambos agregados al diluyente comercial INRA para congelamiento profundo del semen del caballo miniatura del Caspio. En este caso evaluaron la movilidad espermática, las anomalías morfológicas y la integridad de membrana, concluyendo que el uso de una concentración del 2% de yema centrifugada en combinación con la lecitina de soja mejoraba significativamente la congelabilidad del semen¹². Sin embargo, estos dos estudios difieren del actual en que el diluyente en ambos casos contenía yema de huevo (ya sea entera o centrifugada) y esa presencia podría explicar los mejores resultados obtenidos por esos autores.

Cuando se realiza el congelamiento profundo, se busca utilizar una curva de enfriamiento óptima que minimice los daños producidos durante el proceso de criopreservación de semen. En ambos trabajos que usaron lecitina de soja

para congelar semen equino^{13, 17}, se implementó una curva lenta de descenso de temperatura, una de ellas durando aproximadamente 40 minutos¹³. Por el contrario, en el presente estudio se utilizó una curva rápida de congelamiento, que ha sido utilizada con éxito en la especie equina y que disminuye los tiempos empleados en el proceso de criopreservación (no más de 7-8 minutos). Esta diferencia en procedimiento quizás haya tenido un impacto en los resultados obtenidos con el AndroMed en semen equino, sobre todo si se toma en cuenta que en los protocolos de congelamiento de semen bovino para el que fue desarrollado, también es utilizado con una curva lenta de descenso de temperatura. Entonces, quizás el protocolo de curva de descenso rápido no sea el adecuado cuando se emplea diluyentes con lecitina de soja.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos, podemos afirmar que el diluyente AndroMed® no evidenció ventajas cuantitativas comparado con otros diluyentes convencionales respecto a la capacidad de congelar semen equino con parámetros mínimos de aceptación *in vitro*, bajo las condiciones en las que se ensayó. Sin embargo este medio permitió una adecuada visualización de los diferentes parámetros espermáticos evaluados con el sistema AndroVision®. Sería importante seguir ensayando alternativas de diluyentes sin yema de huevo, siendo que lograr un medio de congelamiento profundo sin proteínas de origen animal impactaría positivamente en el comercio internacional de semen equino, disminuyendo no solo los riesgos sanitarios sino también facilitando la elaboración de los medios y mejorando la evaluación *in vitro* de los parámetros seminales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S.; Hinsch, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003; 60(2): 269-279.
2. Ali, M.; Musa, M.; Alfadul, S.; Al-Sobayel, K. Consequences of adding gum Arabic as a cryoprotectant on

- motility and viability of frozen stallion semen. *Cryobiology* 2017; 79: 21-28.
3. Aurich, C.; Seeber, P.; Müller-Schlösser, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reproduction Domestic Animals* 2007; 42: 445-448.
 4. Blommaert, D.; Thierry, F.; Donnay, I.; Lejeune, J.; Detilleux, J.; Sertheyn, D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology* 2016; 72: 27-32.
 5. Bousseau, S.; Brillard, J.P.; Marguant-Le Guienne, B.; Guerin, B.; Camus, A.; Lechat, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 1998; 50: 699-706.
 6. Cristanelli, M.J.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 1984; 22 (1): 39-45.
 7. Layek, S.S.; Mohanty, T.K.; Kumaresan, A.; Parks, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science* 2016; 172:1-9.
 8. Lima-Verde, I.B.; Johannisson, A.; Ntallaris, T.; Al-Essawe, E.; Al-Kass, Z.; Nongbua1, T.; Dórea, F.; Lundeheim, N.; Kupisiewicz, K.; Edman, A.; Morrell, J.M. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018; 53:127-136.
 9. Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Martínez, F.; García, A.; Jerez, R. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrología* 2012; 44: 605-610.
 10. Martin, J.C.; Klug, E.; Gunzel, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979; 27:47-51.
 11. Miragaya M.H.; Chaves M.G.; Neild, D.M.; Bereitta, C.; Agüero, A. Artificial insemination using semen cryopreserved with a simple manual method. In: Proc. Third International Symposium on Stallions Reproduction, January 10-12, Fort Collins, Colorado, USA. / *Fertility and Sterility*. 2001; 68: 336-337.
 12. Nouri, H.; Towhidi, A.; Zhandi, M.; Sadeghi, R. The Effects of Centrifuged Egg Yolk Used with INRA Plus Soybean Lecithin Extender on Semen Quality to Freeze Miniature Caspian Horse Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33(12): 1050-1053.
 13. Papa, F.; Felício, G.; Melo-Oña, C.; *et al.* Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science* 2011; 129: 73-77.
 14. Petrunkina, A.M.; Gröpper, B.; Töper-Petersen, E.; Günsel Apel, R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 2005; 63: 1390-1406.
 15. Pillet, E.; Duchamp, G.; Batellier, F.; *et al.* Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 2011; 75: 105-114.
 16. Pillet, E.; Labbe, C.; Batellier, F.; *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 2012; 77: 268-279.
 17. Ricker, J.; Linfor, J.; Delfino, W.; Kysar, P.; Scholtz, E.; Tablin, F.; Crowe, J.; Ball, B.; Meyers, S. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reproduction* 2006; 74, 359-365.
 18. Rocha, A.; Martin, I.; Monteiro, G.; Guasti, P.; Sancier-Silva, Y.; Papa, F. Effect of addition of soybean lecithin to Botu-Crio® on sperm parameters and fertility rates of frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32: 510-511.
 19. Sieme, H.; Oldenhof, H.; Wolkers, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* 2016; 169: 2-5.
 20. Watson, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* 1981; 62: 483-492.
 21. Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 60/61: 481-492.