

ARTÍCULO DE REVISIÓN

CONGELAMIENTO DE SEMEN DE BURRO (*Equus asinus*)

FREEZING OF DONKEY SEMEN (*EQUUS ASINUS*)

Igor Frederico Canisso^{1,2}, Fernando Andrade Souza³, Jeanny Marlén Ortigoza Escobar⁴, Giovanni Ribeiro de Carvalho⁴, Mina C. Davies Morel¹, Erotides Capistrano da Silva⁴, José Domingos Guimarães⁴ y Anali Linhares Lima⁵

RESUMEN

Por muchas décadas, el desarrollo y utilización de la inseminación artificial en los équidos, especialmente con semen congelado, estuvo restringido, principalmente, por imposiciones de las asociaciones de criadores. Recientemente, las legislaciones de criadores de équidos en varios países se han tornado más flexibles, permitiendo el registro de productos oriundos de semen congelado. En el Brasil, frente a ese nuevo cambio, la principal asociación de criadores de burros (Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga) revisó sus conceptos y comenzó a permitir la utilización de esta biotecnología. Asimismo, en muchos países, el mayor interés en el asno o burro como semental está relacionado a la producción de mulares, pues estos animales son deseables en el medio rural, debido a que reúnen las mejores características del burro y del caballo. Los primeros trabajos en congelamiento de semen de asnos utilizaron dilutores a base de yema de huevo y glicerol, y ampollas de vidrio como sistema de envase, basados en la metodología de congelamiento de toros. Sin embargo, pese al tiempo transcurrido, pocas investigaciones han sido dirigidas a esta especie, en especial a biotecnologías del semen. En esta revisión de literatura se discuten las principales técnicas de congelamiento de semen de équidos y se describen estudios referentes al congelamiento de semen de la especie asnal.

Palabras clave: criopreservación, semen, asnos, burros

ABSTRACT

For decades, the development and use of the artificial insemination in the equine, especially with frozen semen, was restricted due to impositions of equine breeders associations that opposed the use of the technique. Recently, these legislations have

¹ Institute of Biological, Environment, and Rural Science, Aberystwyth University of Wales, United Kingdom. www.irs.aber.ac.uk

² E-mail: canissoif@yahoo.com.br

³ Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil www.vet.ufmg.br

⁴ Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, www.ufv.br

⁵ ESALQ/Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. www.esalq.usp.br

become more flexible in several countries, allowing the registration of products originating from frozen semen. In Brazil, based on these changes, the main donkey breed association (Brazilian Breeders Association of the Pêga Donkeys) revised their concepts and started to allow the use of this biotechnology. The current interest in many countries for the donkey sire is the production of mules, because their acceptability as these animals inherits suitable characteristics of both donkeys and horses. The first reports on donkey frozen semen used extenders based on egg yolk and glycerol, packed in glass ampoules, and followed the existing methodology for freezing bull semen. However, despite of the elapsed time, few research works have been carried out on this species, especially on semen. This literature review discussed the main techniques of freezing equine semen and describes studies on freezing of sperm of asinine species.

Key words: cryopreservation, semen, donkey

RESUMO

Por muitas décadas, o desenvolvimento e utilização da inseminação artificial nos eqüídeos, principalmente com sêmen congelado, esteve restrito devido a imposições por muitas associações de criadores que não permitiam a utilização da técnica. Recentemente, as legislações das associações de criadores de eqüídeos em diversos países do mundo se tornaram mais flexíveis, permitindo o registro de produtos oriundos de sêmen congelado. No Brasil, frente a essa nova mudança, a principal associação criadores de jumentos (Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga), revisou seus conceitos e passou a permitir a utilização desta biotecnologia. Atualmente em muitos países, o maior interesse no reprodutor jumento é para a produção de muaras, pois esses animais são produtos bastante desejáveis no meio rural, devido reunirem as melhores características destas duas espécies. O primeiro trabalho envolvendo o congelamento de sêmen de jumentos utilizaram diluidor a base de gema de ovo, glicerol e ampolas de vidro como sistema de envase baseados na metodologia de congelamento de touros. Contudo, apesar da longa data de início dos estudos, poucas pesquisas têm sido direcionadas à espécie, em especial a biotecnologias do sêmen. Nesta revisão de literatura discute se as principais técnicas de congelamento de sêmen de eqüídeos bem como descrição detalhada dos estudos envolvendo o congelamento de sêmen da espécie asinina.

Palavras chave: congelamento, sêmen, jumentos

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías de la reproducción son herramientas de gran importancia al servicio de la equinocultura mundial, siendo un instrumento directo de mejoramiento genético. Las ventajas que ofrece la inseminación artificial (IA) son tan vastas que, tal vez, sea la biotecnología con mayor impacto en la producción équida, pues un reproductor

puede dejar centenares de descendientes a lo largo de su vida reproductiva, si es que la IA es empleada adecuadamente en sus diferentes modalidades (Canisso, 2008).

Por muchas décadas, el desarrollo y utilización de la IA en los équidos, principalmente con semen congelado, estuvo limitado por imposiciones de muchas asociaciones de criadores que no permitían su utilización (Samper, 2007). Recientemente, las legislaciones de las

asociaciones de criadores de équidos en diversos países del mundo se han ido flexibilizando, permitiendo el registro de productos oriundos de esta biotecnología, originando un gran impacto en la industria ecuestre, especialmente en EEUU (Loomis, 2006), Europa (Aurich y Aurich, 2006) y Brasil (Papa *et al.*, 2005). Por ejemplo, la Asociación Americana del Caballo Cuarto de Milla y la Asociación Americana de Paint Horse permitieron la utilización del semen congelado a partir del año 2000, y estas dos asociaciones responden por cerca de 5.1 millones de caballos registrados. Es así que el mercado de semen congelado de los équidos se valorizara a nivel mundial. Asimismo, la principal asociación de criadores de asnos del Brasil (Associação Brasileira de Criadores de Jumento Pêga) revisó sus conceptos y ya permite la utilización de esta biotecnología.

Actualmente, en Brasil y en el mundo, el mayor interés en la crianza del burro como reproductor es para la producción de mulares (Oliveira *et al.*, 2006; Canisso, 2008). Estos son productos bastante deseables en el medio rural, pues reúnen las mejores características de las dos especies en un único animal (Santos, 1994). No obstante, en la literatura se observa un reducido número de publicaciones relacionadas con el congelamiento de semen de asnos (Vidament *et al.*, 2005, 2008; Canisso, 2008).

En general, los procedimientos utilizados para el congelamiento de semen de équidos implican el examen andrológico, colecta de semen, evaluación seminal, dilución, centrifugación, desecho del sobrenadante, resuspensión del pellet con el dilutor de congelamiento, envasado, refrigeración, estabilización del semen, congelamiento y evaluación seminal post descongelado (Papa, 1987). Hasta el momento no existe un procedimiento estandarizado para cada una de estas etapas, de allí que haya mucha variación entre los resultados experimentales y los procedimientos rutinarios de campo (Klug, 1992; Squires *et al.*, 1999; Vidament, 2005; Aurich y Aurich, 2006).

En una encuesta realizada por Samper y Morris (1998) con la participación de Argentina, Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Francia, Finlandia, Alemania, Italia, Países Bajos, Polonia, Sudáfrica, Suecia y los Estados Unidos, considerados en el momento de estudio, países donde la inseminación en équidos con semen congelado era practicada con mayor relevancia, se encontró 35 recomendaciones diferentes entre los procedimientos. De esta manera, el presente trabajo tuvo por objetivo revisar los principales aspectos involucrados en la aplicación de la congelación de semen de asnos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Congelación de Semen

a) *Colecta de Semen*

Los mejores resultados se obtienen cuando el reproductor ha agotado sus reservas espermáticas extragonadales, lo cual se logra mediante colectas o cubiertas frecuentes. Esto permite obtener eyaculados homogéneos y concentraciones espermáticas constantes en los reproductores (Amann y Pickett, 1987).

Se puede emplear yeguas, burras o maniqués artificiales (tipo «phantom» o «dummies») para la colecta del semen, aunque los mejores resultados se han obtenido con burras (Kreuchauf, 1984) o yeguas en estro (Canisso *et al.*, 2008). Asimismo, se prefiere el uso de la vagina artificial, debidamente acondicionada (Kenney *et al.*, 1983; Varner *et al.*, 1991), sin el empleo de lubricación debido a los potenciales efectos nocivos, principalmente osmóticos, de los lubricantes (Samper, 2007).

Después o durante la colecta, el semen debe ser filtrado y la fracción gelatinosa ser separada de la fracción rica en espermatozoides (Kenney *et al.*, 1983; Papa, 1987; Gastal, 1991). Posterior a la separación de las fracciones, se realiza la evalua-

ción espermática de forma subjetiva, con el microscopio de luz, u objetiva a través de análisis computarizados (Davies Morel, 1999). En el caso del análisis objetivo, el semen debe ser diluido, en tanto que en el análisis subjetivo se puede realizar sin dilución, aunque es deseable que se haga la dilución para garantizar una adecuada protección espermática contra las variaciones de temperatura ambiente, y para facilitar la acción del antibiótico presente en el dilutor (Varner *et al.*, 1991).

Las evaluaciones de rutina utilizadas en el precongelamiento del semen corresponden a la motilidad total, motilidad progresiva, vigor espermático, concentración espermática, volumen seminal sin gel, y el aspecto seminal. Además, se toman muestras para el análisis de morfología espermática (Kreuchauf, 1984; Davies Morel, 1999; Fürst *et al.*, 2005; Canisso, 2008).

b) Dilución y Centrifugación

El semen y el medio extensor deben encontrarse a la misma temperatura en el momento de la dilución (Davies Morel, 1999). Se puede hacer a 37 °C si se realiza inmediatamente después de la colecta, o a los 22 °C si se realiza un enfriamiento del semen, conforme al protocolo francés de congelamiento (Vidament, 2005).

Los dilutores empleados previo a la centrifugación del semen varían de acuerdo al país. Entre ellos se encuentran la solución sacarosa al 11% (Piao *et al.*, 1988), solución glucosa EDTA (Martim *et al.*, 1979; Klug, 1992), solución de lactato de ringer, solución de ringer lactato enriquecido con medio Kenney, medio dilutor de Kenney (Serres *et al.*, 2002; Canisso, 2008), y los medios INRA 82, INRA 96, y leche desnatada ultra-pasteurizada (Vidament, 2005; Vidament *et al.*, 2005, 2008). La mayoría son variantes del diluyente de mínima contaminación propuesto por Kenney *et al.* en 1995 (Squires *et al.*, 1999; Papa *et al.*, 2005; Raphael, 2007).

La tasa de dilución seminal ha variado con el tiempo (Amann y Pickett, 1987). No obstante, en la actualidad los investigadores y extensionistas concuerdan en utilizar una parte de semen y una parte de dilutor como la dilución más adecuada (Davies Morel, 1999; Squires *et al.*, 1999; Arruda, 2000; Alvarenga, 2002; Papa *et al.*, 2005; Loomis, 2006; Samper *et al.*, 2007; Canisso, 2008).

El semen, una vez diluido, debe ser centrifugado, a fin de concentrar los espermatozoides para permitir una segunda dilución posterior; y remover parte del plasma seminal que tiene efectos nocivos sobre la motilidad espermática (Amann y Pickett, 1987).

En la centrifugación se pueden utilizar tubos de ensayo graduados con capacidad de 10, 15 ó 50 ml, aunque pareciera que los de 10 ml ofrecen mayores ventajas (Amann y Pickett, 1987). Si bien la centrifugación es un proceso obligatorio para el congelamiento de semen de équidos, no es un proceso inocuo al espermatozoide. La centrifugación puede inducir la peroxidación lipídica de las membranas espermáticas (Raphael, 2007), por lo que se recomienda fuerzas de centrifugación leves (400 a 600 g) por 15 minutos (extremos de 10 a 20 minutos) (Amann y Pickett, 1987; Papa, 1987; Arruda, 2000; Alvarenga, 2002; Serres *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 2005).

Luego de la centrifugación, en el sobrenadante se encuentra el plasma seminal, el dilutor y algunas pocas células de descamación y algunos espermatozoides, mientras que en la porción inferior se encuentra el pellet que es una especie de agregado de espermatozoides, plasma seminal y dilutor. En esta fracción se encuentra cerca del 85% de los espermatozoides (Papa, 1987; Squires *et al.*, 1999). El sobrenadante se remueve cuidadosamente con una pipeta o equipo adaptado, y el semen restante debe ser gentilmente resuspendido con el diluyente de congelamiento, a través de suaves movimientos de succión y eyección (Varner *et al.*, 1991; Squires *et al.*, 1999; Canisso *et al.*, 2007).

c) Dilución de Congelamiento y Envasado

La cantidad de dilutor que se añade al pellet, luego de la centrifugación, depende de la concentración espermática (Loomis, 2006). Actualmente, se recomienda una tasa de dilución seminal de 200 millones de espermatozoides/ml (Arruda, 2000; Canisso, 2008). Se tiene la experiencia de Nascimento *et al.* (2008), quien a través de la citometría de flujo y uso del programa de cómputo CASA, obtuvo mejores resultados de semen congelado en pajuelas de 0.5 ml con el uso de concentraciones de 200 millones versus 100 y 400 millones de espermatozoides/ml.

Los resultados de investigaciones en congelación de semen bovino, especialmente en lo referido al envasado del semen, han sido usualmente extrapolados al manejo del semen de caballos y burros. Inicialmente, el semen de équidos fue congelado en ampollas de vidrio (Polge y Minotakis, 1964) y posteriormente, en la forma de pellets (Merkt *et al.*, 1975). Al final de la década del 70 se empleó el macrotubo (Martim *et al.*, 1979) y en algunos países de Europa oriental se usaron tubos de aluminio (Tischner, 1979). En la década siguiente y hasta la actualidad prevalece el uso de la pajuela francesa de 0.5 ml (Loomis *et al.*, 1983; Amann y Pickett, 1987; Arruda *et al.*, 1989a; Alvarenga, 2002; Loomis, 2006). No obstante, Oliveira *et al.* (2006), en un estudio reciente en semen de burros de la raza Brasileira Pêga no encontraron diferencias estadísticas entre el uso de la pajuela francesa de 0.5 ml y el macrotubo de 2.5ml.

La metodología de envase en pajuelas ofrece ventajas adicionales como la practicidad proporcionada en el llenado y sellado, identificación permanente, congelamiento homogéneo y su fácil adquisición (Arruda *et al.*, 1986).

d) Enfriamiento

El semen debe ser enfriado previo al proceso de congelación. Las tasas ideales de

enfriamiento del semen equino fueron demostradas por Varner *et al.* (1988), quienes observaron que las tasas de enfriamiento pueden afectar la capacidad de retención de la motilidad. No obstante, el enfriamiento tiene poco o ningún efecto perjudicial sobre la célula espermática si se utiliza un dilutor adecuado. La temperatura del semen puede bajar de 37 a 20 °C sin efectos adversos para la motilidad (Kayser *et al.*, 1992), pero temperaturas entre 19 y 8 °C son críticas para el espermatozoide equino (Morán *et al.*, 1992; Keith, 1998); sin embargo, el enfriamiento puede realizarse rápidamente de 8 a 5 °C (Morán *et al.*, 1992). No hay información precisa sobre el particular para semen de burros pero posiblemente puede aplicarse estos hallazgos.

Entre 8 y 5 °C, la membrana espermática está en una fase de transición del estado líquido cristalino al estado de gel (Graham, 1996), pudiendo ocurrir un choque térmico caracterizado por pérdida de motilidad, fertilidad y movimiento circular cerrado si no se toman las precauciones necesarias (Alvarenga, 2002). Ocurren daños en la membrana plasmática, así como reducción del metabolismo de carbohidratos, desbalance catión-iónico, pérdida del contenido intracelular como enzimas y lípidos entre otros. Asimismo, el acrosoma parece ser esencialmente afectado por el choque frío, pudiendo exhibir aumento de volumen o vesiculación (Keith, 1998).

La refrigeración del semen induce a una serie de cambios en la composición y organización de la bicamada lipídica (Squires *et al.*, 1999). De este modo, cuando la temperatura disminuye, el movimiento lateral de los fosfolípidos se torna más restringido, exhibiendo una transición de la fase fluida para gel con formación de arreglos hexagonales (Watson, 1996). Alteraciones fisico-químicas de las membranas espermáticas, causadas por el enfriamiento, pueden ser irreversibles como la disminución de la fluidez y aumento en la permeabilidad de la membrana, daños acrosomales, liberación de enzimas y

fosfolípidos, reducción en la actividad metabólica y en el consumo de ATP (Farstad, 1996).

Se tiene la experiencia de Fürst (2002), quien desarrolló un sistema de enfriamiento artesanal donde se baja la temperatura del semen de 22 hasta 8 °C durante 35 minutos (-0.5 °C/min), para luego ser dejado por 25 minutos en la nevera para la estabilización previa al inicio del congelamiento. Este método ha sido utilizado para semen de caballos de las razas Bretón y Mangalarga Marchador, con buenos resultados de fertilidad (Fürst, 2006).

En el rango de temperatura donde el espermatozoide es más susceptible al choque térmico, el semen debe ser enfriado gradualmente. Estas tasas de enfriamiento se agrupan en tres categorías: lentas (<-0.33 °C/min), medias (-0.33 a -1.0 °C/min), y rápidas (>-1.0 °C/min) (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984). Sin embargo, las mejores curvas de enfriamiento para asnales en semen mantenido a 5 °C, fueron de -0.6 a -1.0 °C/min (Santos, 1994).

e) Congelación

Las células espermáticas son desafiadas a pasar por una fase crítica de congelamiento que ocurre en temperaturas de -15 a -50 °C (Mazur, 1980). Los cambios celulares que ocurren durante la congelación no están asociados a su habilidad de almacenarse a temperaturas muy bajas, sino a los efectos nocivos del pasaje por temperaturas intermedias (-15 a -60 °C), que el espermatozoide tiene que atravesar en dos oportunidades; una durante el congelamiento y otra durante el descongelamiento (Squires *et al.*, 1999). Durante el proceso de congelación, una vez se pase por esas temperaturas, cesa la actividad metabólica y las células se tornan durmientes.

El espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al encontrarse en nitrógeno líquido (-196 °C). Esto es debido a que no existe agua

líquida pasando -130 °C, ya que el estado físico del agua está en la forma de cristales, y en ese estado la viscosidad es alta y la difusión prácticamente no ocurre; además, no hay energía térmica para una reacción química (Keith, 1998).

Los protocolos de congelación no han establecido una curva ideal de congelación, probablemente debido a la composición extremadamente variable del medio dilutor, y a los tipos y concentración de los crioprotectores (Heitland *et al.*, 1996). En la mayoría de los protocolos disponibles se describe una curva de congelamiento rápida de -60 a -70 °C/min, con exposición de las pajuelas en forma horizontal sobre una gradilla, a 3 cm por encima del vapor del nitrógeno líquido (Papa, 1987; Fürst *et al.*, 2005; Fürst, 2006). Pasada esta fase, el semen se sumerge en el nitrógeno líquido, donde puede ser almacenado por tiempo indeterminado (Squires *et al.*, 1999). Cristanelli *et al.* (1985), sin embargo, no encontró diferencias significativas en los porcentajes de motilidad progresiva en espermatozoides equinos congelados en el vapor de nitrógeno a una altura de 4 cm versus al congelamiento en congelador automático con curvas programadas.

f) Descongelación

El descongelamiento del semen se realiza en baño maría, a temperaturas que varían de acuerdo con el recipiente de envase utilizado y con la disponibilidad de equipamiento. Para semen congelado en pajuelas francesas de 0.5 ml se recomienda el descongelamiento a 37 °C por 30 segundos o a 75 °C por 7 segundos (Arruda, 2000; Samper *et al.*, 2007). Sin embargo, hay algunos resultados contradictorios respecto a cual sería la mejor temperatura y tiempo (Davies Morel, 1999). En este sentido, Fürst *et al.* (2005), si bien no observaron diferencias en las motilidades total y progresiva para estas temperaturas y tiempos, el vigor espermático medio fue mejor al descongelar a 75 °C por 7 segundos.

Estudios en Semen de Burros

Aparentemente, el primer trabajo sobre congelación de semen de burros fue realizado por Polge y Minotakis (1964), con un dilutor a base de yema de huevo y glicerol, envasando el semen refrigerado en ampollas de vidrio, siguiendo la metodología de congelación del semen bovino. Posteriormente, Krause y Grove (1967) evaluaron dilutores a base de glucosa, lactosa y rafinosa con yema de huevo y glicerol en semen de burros y caballos, y siguiendo la metodología del semen bovino en pellets (Nagase y Niwa, 1964), obteniendo motilidades después del descongelamiento de 50 a 70%, con resultados de fertilidad muy variables.

Kreuchauf (1984) utilizó la metodología de Martim *et al.* (1979) con un medio dilutor glucosa-yema EDTA y envase en criotubo alemán de tipo macrotubo de 5 ml, y la comparó con semen almacenado en la forma de pellet, para el cual se empleó el dilutor de Nagase y Graham (1964). Las motilidades post descongelación resultantes fueron de $44 \pm 7\%$ y $50 \pm 10\%$, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ambas.

En China se ha reportado un programa de inseminación artificial de cerca de 90,000 yeguas y burras con semen congelado de potros y burros entre 1982 a 1987, utilizando un dilutor a base de yema de huevo y glicerol (Piao *et al.*, 1988).

En Francia, Trimeche *et al.* (1996) evaluaron el medio INRA 82 (Palmer, 1984) modificado, en semen de burros Poitou. El dilutor contenía 2% de yema de huevo de codorniz y 4% de glicerol, con la adición de glutamina en concentraciones de 80, 120 y 240 mM, encontrando una mejora significativa en la motilidad post descongelamiento con relación al aumento de la concentración del aminoácido. Según los autores, la glutamina aumenta la osmolaridad del medio, así como en los procesos metabólicos del espermatozoide. La composición química de la yema de huevo de codorniz es muy similar a la yema

de huevo de gallina; no obstante, la primera posee mayor proporción de fosfatidilcolina y menor proporción de fosfatidiletanolamina, además de mejor índice de ácidos grasos poliinsaturados (Trimeche *et al.*, 1997). Basados en estas diferencias, Trimeche *et al.* (1996) utilizaron el medio INRA 82 en el congelamiento de semen de asnos Poitou, empleando diferentes concentraciones de yema de huevo de los dos tipos, encontrando mejores resultados para el semen congelado conteniendo 10% de yema de huevo de codorniz.

En un trabajo posterior, Trimeche *et al.* (1998) evaluaron cuatro dilutores utilizando semen de burros Poitou en una concentración final de 60×10^6 espermatozoides/ml en pajuelas francesas de 0.5 ml. El dilutor basal contenía 126.2 mM de glucosa, 4.2 mM lactosa, 2.5 mM rafinosa, 1 mM de citrato de sodio, 1.3 mM citrato de potasio, 4% de glicerol, 2% de yema de huevo de codorniz, 83.3 mg de penicilina, 100 mg de gentamicina, 1 L de leche desnatada y 1 L de agua destilada, con una osmolaridad de 288 mOsm/kg. Los otros dilutores contenían a) el medio basal con 80 mM de L-glutamina (370 mOsm/kg), b) medio basal con 10% de yema de huevo (290 mOsm/kg), y c) medio con 80 mM de L-glutamina y 10% de yema de huevo (375 mOsm/kg); siendo mejor el último dilutor (llamado T2-94) en términos de integridad de la membrana espermática y motilidad. Este dilutor, con o sin la remoción del glicerol después de la descongelación, se evaluó en 13 burras inseminadas diariamente, desde la detección del folículo de 30 mm hasta la detección de la ovulación. Cuando no se removió el glicerol ninguna burra quedó preñada, mientras que cuando fue removido se obtuvo el 38.9% de fertilidad (8/21 ciclos).

Dilutores conteniendo concentraciones entre 2.5 a 5% de dimetilformamida y metilacetamida, donde el grupo control contenía 2.5% de glicerol, se evaluaron en burros de la raza española Zamorano-Leonés (Alvarez *et al.*, 2004). En este estudio se evaluó la integridad de la membrana median-

te la prueba hiposmótica (HOST), y la integridad del acrosoma por citometría de flujo con el uso de la sonda fluorescente (FITC-PSA), encontrándose que la dimetilformamida al 5% presentó los mejores resultados. También se evaluó en la misma raza de burros el efecto de incubar el semen por 15 minutos a 20 ó 37 °C, usando 0, 1.5, 2.0, 2.5 ó 3 mg de ciclodextrina-glicerol/120 x 10⁶ espermatozoides (Alvarez *et al.*, 2006), y congelando en el medio dilutor de Martim *et al.* (1979) conteniendo 2.5% de glicerol. La evaluación del congelamiento se hizo en base a los parámetros anteriores encontrando que la mejor temperatura para la adición de colesterol con uso de ciclodextrina fue de 20 °C, y la mejor concentración de ciclodextrina-glicerol fue de 2.0 mg/120 millones de espermatozoides.

La concentración de glicerol (2.5 y 5%) se evaluó en semen de burros Zamorano-Leonés utilizando el dilutor propuesto por Martim *et al.* (1979) y el dilutor propuesto por Burns (1992), que es una mezcla del primero con dilutor de mínima contaminación de Kenney *et al.* (1975) (Serres *et al.*, 2004). Se determinó, mediante el programa CASA, la integridad acrosomal (FITC-PSA) por citometría de flujo e integridad de la membrana por medio de HOST, encontrando que tanto la concentración de 2.5% de glicerol como en primer dilutor obtuvieron mejores resultados.

En fechas más recientes, Vidament *et al.* (2005) congelaron con éxito semen de burros Baudet du Poitou con buenos resultados de motilidad, utilizando la técnica francesa de congelamiento validada por este grupo (Vidament *et al.* 2000); sin embargo, los resultados de fertilidad en yeguas y burras fueron bajos. Más recientemente, este grupo evaluó varias concentraciones de crioprotectores sobre la fertilidad del semen congelado de burros Baudet du Poitou, Grand Noir du Berry y Pyénéen, empleando la misma metodología, concluyendo que la alta concentración de glicerol tiene efectos deletéreos sobre los espermatozoides de asnos, espe-

cialmente cuando la inseminación artificial se lleva a cabo previo a la ovulación. Sin embargo, los autores consideran que puede haber una interacción entre el glicerol-dilutor a base de leche y el aparato reproductivo de la burra (Vidament *et al.*, 2008).

La Experiencia Brasileña

El primer estudio en Brasil fue descrito por Viera *et al.* (1985) con un burro de la raza Pêga. Usaron eyaculados con >300 millones de espermatozoides por ml, >70% de motilidad progresiva y <10 de espermatozoides anormales y, además, el semen debía presentar >40% de motilidad progresiva post descongelación para ser utilizado. El semen fue diluido en lactosa-yema-EDTA y centrifugado a 1000 g por 5 minutos. Posteriormente, el pellet fue resuspendido a una concentración de 250 millones de espermatozoides por pajueta de 0.5 ml, y congelado. Nueve yeguas fueron inseminadas en 20 celos luego de la ovulación. El semen se descongeló a 75 °C por siete segundos, y rediluido en 10 ml del mismo medio, usándose entre 400 a 500 millones de espermatozoides con movimiento progresivo. El semen se depositó en forma intracornual profunda e ipsilateral a la ovulación. La tasa de concepción final fue de 66.7%; sin embargo, la fertilidad por periodo de celo fue de 30%.

Arruda y su equipo de investigadores trabajaron en la década del 80 con semen de burro de la raza Brasileña, así como con caballos Pura Sangre Árabe, utilizando el dilutor de Martim *et al.* (1979) y otro a base de lactosa-EDTA-yema de huevo, congelando el semen en pajuelas francesas de 0.5 ml (Arruda *et al.*, 1986, 1989a,b). Los resultados mostraron una motilidad media de 44.3 ±11.0% y vigor medio de 3.85 ± 0.41 (Arruda *et al.*, 1989a), proponiendo como valores ideales mínimos para buenos resultados de congelamiento concentraciones espermáticas ? 300 x 10⁶ espermatozoides/ml, motilidad progresiva ? 70% y patología espermática total ? 25%.

Por su parte, Silva *et al.* (1997) utilizaron burros de la raza nordeste y mestizos, de 3 a 12 años, diluyendo el semen en medio glucosa-EDTA, centrifugando a 600 g x 10 minutos y resuspendiendo el pellet en el dilutor lactosa-yema propuesto por Martim (Martim *et al.*, 1979). El semen, con una concentración de 100 millones de espermatozoides/ml, fue envasado en macrotubos de 4 ml y en un tubo rectangular, de tipo crema dental, con capacidad de 10 ml, sin encontrar diferencias estadísticas entre ellos, con relación a motilidad, vigor en la prueba de termorresistencia por 240 minutos, y a través de la morfología espermática.

En semen de Pêga se comparó la metodología descrita por Martim *et al.* (1979) con una metodología desarrollada por el grupo de Papa (Papa *et al.*, 1999) a través del uso de un dilutor denominado M9H. Este consistía en una mezcla del dilutor anterior con adición del medio propuesto por Kenney (Kenney *et al.*, 1975) y del medio de cultivo celular BME (Basal Medium Eagle). El semen fue diluido primeramente con una solución conteniendo 50% del medio Kenney y 50% de Ringer lactato, centrifugado a 600 g durante cinco minutos y el pellet resultante fue resuspendido en uno de los dos dilutores descritos y congelado con 100 millones de espermatozoides por pajueta francesa de 0.5 ml. Las pajillas con >50% de motilidad, retención de acrosoma de 70% y vigor de tres se usaron para inseminar tres yeguas Mangalarga, quedando dos yeguas gestantes.

También se evaluó el efecto de 10 combinaciones de crioprotectores a base de dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metilformamida, glicerol, dimetilacetamida, metilformamida, dimetilsulfóxido, y etilenoglicol (Oliveira, 2006), así como el efecto del macrotubo de 2.5 ml y la pajueta francesa de 0.5 ml en semen de asno diluido con MP 50 (Papa *et al.*, 2002). Se evaluó la motilidad con el análisis objetivo Hamilton

Thore y se hizo pruebas de microscopía con fluorescencia. No se encontró diferencias entre los sistemas de envase en evaluaciones *in vitro*. La motilidad post descongelamiento para motilidad con el programa CASA demostró que el mejor crioprotector fue a base de acetamida. Sin embargo, en las pruebas de fertilidad, 4 de las 10 yeguas inseminadas quedaron gestantes, en tanto que ninguna de las 53 burras preñó.

Recientemente, Canisso *et al.* (2007), agregaron orvus-es-past (OEP) al medio original propuesto por investigadores japoneses (Nagase y Niwa, 1964) en la proporción de 0.08 ml de OEP/20 ml de yema de huevo, comparándolo con el dilutor propuesto por Martim (Martim *et al.*, 1979) en la congelación de semen de burros Pêga. Los resultados de fertilidad fueron de 54 y 53%, respectivamente, para cada dilutor en 60 yeguas Campolina.

Consideraciones Finales

El macho asnal es utilizado en varios países del mundo como donador de semen, principalmente, para la producción de mulares. El congelamiento de semen puede ser empleado para maximizar el uso de reproductores genéticamente superiores para la inseminación artificial de burras, o para la producción de mulares de silla o de tracción, y también para la conservación de material genético de razas asnales amenazadas de extinción.

Las técnicas actuales empleadas en el congelamiento de semen de burros se basan en metodologías extrapoladas de manipulación de semen de caballos reproductores. El número de trabajos de investigación empleando semen de burros es muy bajo en la literatura científica; por lo tanto, se hace necesario una mayor investigación para el desarrollo y mejora de las metodologías de congelación de semen propias para asnales.

LITERATURA CITADA

1. **Alvarenga MA. 2002.** Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões. Tese de Livre Docência em Reprodução Animal. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 87 p.
2. **Alvarez AL, Serres C, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétaral C. 2004.** Cryopreservation of Zamorano-Leonés donkey sperm using different amides. *Reprod Domest Anim* 39: 267 (Abstr.).
3. **Alvarez AL, Serres C, Torres P, Crespo F, Mateos E, Gómez-Cuétaral C. 2006.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 95: 89-91.
4. **Amann RP, Pickett BW. 1987.** Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7: 145-173.
5. **Arruda RP. 2000.** Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Tese de Livre Docência em Reprodução Animal. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. de São Paulo. 120 p.
6. **Arruda RP, Vieira RC, Barbosa RT, Manzano A. 1989a.** Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. *Rev Bras Reprod Anim xx(Supl.1):* 215.
7. **Arruda RP, Vieira RC, Barbosa RT, Manzano A. 1989b.** Características Seminais de equídeos destinados a seleção para a congelação. *Rev Bras Reprod Anim (Supl. 1):* 214.
8. **Arruda RP, Vieira RC, Manzano A. 1986.** Inseminação artificial de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0.5 mL. In: *Anais do XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária.* Cuiabá, MT: Universidade Federal de Mato Grosso. p 181.
9. **Aurich J, Aurich C. 2006.** Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reprod Domest Anim* 41: 275-279.
10. **Burns PJ. 1992.** Modification of Kenney's extender for cryopreservation of equine spermatozoa, In: *XII ICAR Meeting.* The Hague: International Congress on Animal Reproduction.
11. **Canisso IF. 2008.** Comportamento sexual, Parâmetros Seminais e Fertilidade do semen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pega. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Viçosa: Universidade Federal de Vicosa. 200 p.
12. **Canisso IF, Carvalho GR, Torres CAA, Guimarães JD, Souza FA, Silva EC, Martins LF. 2008.** Sexual behavior of jacks when an estrous mare is used in semen collection. *Anim Reprod Sci* 107: 314-314.
13. **Canisso IF, Carvalho GR, Silva Filho JM, Ker PG, Rodrigues AL, Silva EC. 2007.** Fertilidade do semen congelado de jumentos da raça Pega em éguas. In: *Anais: XVII Congresso Brasileiro de Reproducao Animal.* Curitiba, Parana: Colegio Brasileiro de Reproducao Animal.
14. **Cristanelli MJ, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. 1985.** Effects of egg yolk and glycerol level in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 24: 681-685.
15. **Davies Morel MCG. 1999.** Equine artificial insemination. Wallingford, Oxon: CAB International. 406 p.

16. **Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol GA. 1984.** Field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22: 291-303.
17. **Farstad W. 1996.** Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 42 : 251-260.
18. **Fürst R. 2002.** Efeito do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen eqüino. Dissertação de Mestrado. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 96 p.
19. **Fürst R. 2006.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas nas fertilidade do sêmen eqüino. Dissertação de Doutorado. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 80 p.
20. **Fürst R, Carvalho GR, Fürst MCO. 2005.** Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. *Arq Bras Vet Zootec* 57: 599-607.
21. **Gastal MMO. 1991.** Estudo do comportamento sexual e características seminais de asininos. Dissertacao de Mestrado. Belo Horizonte: Escola de Veterinaria, Universidade Federal de Minas Gerais. 101 p.
22. **Graham JK. 1996.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin N Am: Equine* 12: 131-145.
23. **Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. 1996.** Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 28: 47-53.
24. **Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. 1992.** Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38: 601-614.
25. **Keith SL. 1998.** Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Master of Science Thesis. Colorado, USA: Colorado State University. 104 p.
26. **Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW. 1975.** Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Pract* 21: 327-336.
27. **Kenney RM, Hurtgen J, Pierson R, Witherspoon D, Simons J. 1983.** Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings, Nebraska: Society for Theriogenology. 100 p.
28. **Klug, E. 1992.** Routine AI application in Hannoverian Sport Horse Breeding Association. *Anim Reprod Sci* 28: 39-44.
29. **Krause D, Grove D. 1967.** Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *J Reprod Fert* 14: 139-141.
30. **Kreuchauf A. 1984.** Reproductive physiology in the jackass. *Anim Res Dev* 20: 51-78.
31. **Loomis PR. 2006.** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin N Am: Equine* 22: 663-676.
32. **Loomis PR, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. 1983.** Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J Anim Sci* 56: 687-693.
33. **Martim JC, Klug E, Gunzel AR. 1979.** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fert (Suppl. 27):* 47-51.
34. **Mazur P. 1980.** Fundamental aspects of freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In: IX ICAR Meeting. Madrid: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.
35. **Merkt H, Klug E, Krause D, Bader H. 1975.** Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *J Reprod Fert (Suppl. 23):* 105-106
36. **Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. 1992.** Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38: 999-1012.
37. **Nagase H, Graham EF. 1964.** Pelleted semen: comparison of different extenders and processes on fertility of

- bovine spermatozoa. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p 387-389.
38. **Nagase H, Niwa T. 1964.** Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: V ICAR meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p 410-415.
 39. **Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. 2008.** Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 28: 351-358.
 40. **Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell'acqua JA, Papa FO. 2006.** Effect of cryoprotectant on donkey semen freezeability and fertility. *Anim Reprod Sci* 94: 82-84.
 41. **Palmer E. 1984.** Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: X ICAR Meeting. Urbana: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p 377.
 42. **Papa FO. 1987.** Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Tese Livre Docência em Reprodução Animal. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 150 p.
 43. **Papa FO, Meira C, Simon JJ, Ferreira JCP, Dell'acqua Jr, JA, Leme DP. 1999.** Pregnancies in mare using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. *Arq Fac Vet UFRGS* 27(1): 262.
 44. **Papa FO, Melo CM, Dell'acqua JA, Macedo LP, Carvalho AG, Alvarenga MA, Medeiros ASL. 2005.** Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Sci Vet* 33(Suppl.1): 19-27.
 45. **Papa FO, Zahn FS, Dell'acqua Júnior JA, Alvarenga MA. 2002.** Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen eqüino. *Rev Bras Reprod Anim* 26: 184-187.
 46. **Piao S, Wang Y, Cheng Y. 1988.** A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: XI ICAR Meeting. Dublin: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.
 47. **Polge C, Minotakis C. 1964.** Deep freezing of jackass and stallion semen. In: V ICAR Meeting. Trento: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. p 545-552.
 48. **Raphael CF. 2007.** Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 111 p.
 49. **Samper JC. 2007.** Reproductive system: evaluation of the breeding system. Anais: Fórum Internacional de Medicina Eqüina- ABRAVEQ, São Paulo. 18 p.
 50. **Samper JC, Estrada AJ, Mckinnon AO. 2007.** Insemination with frozen semen. In: Samper JC, Pycok JF, Mckinnon AO (ed). *Current therapy in equine reproduction*. Saint Louis: Elsevier-Saunders. p 285-288.
 51. **Samper JC, Morris CA. 1998.** Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey. *Theriogenology* 49: 895-903.
 52. **Santos GF. 1994.** Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozóides de jumentos (*Equus asinus*) preservados a 5 °C. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 82 p.

53. **Serres C, Álvarez AL, Rodríguez A, Santiago I, Mateos E, Gómez-Cuétaral C. 2004.** Effect of extender and glycerol concentration on cryopreservation of semen from the Zamorano-Leonés donkey. *Reprod Domest Anim* 39: 267 (Abstr).
54. **Serres C, Rodríguez A, Álvarez AL, Santiago I. 2002.** Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. *Theriogenology* 58: 329-332.
55. **Silva SS, Henry M, Nunes AS, Mello SLV. 1997.** Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*) avaliada *in vitro* pós-descongelação. *Rev Bras Reprod Anim* 21: 140-146.
56. **Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Brummer JE. 1999.** Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University. Bulletin 9.
57. **Tischner M. 1979.** Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fertil (Suppl. 27)*: 53-59.
58. **Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. 1997.** Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacks sperm. *Cryobiology* 34: 385-393.
59. **Trimeche A, Renard P, Lelannou D, Barrière P, Tainturier D. 1996.** Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology* 45: 1015-1027.
60. **Trimeche A, Renard P, Tainturier D. 1998.** A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology* 50: 793-806.
61. **Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. 1988.** Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology* 29: 1043-1054.
62. **Varner D, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. 1991.** Disease and management of breeding stallions. Goleta, California: American Veterinary. 349 p.
63. **Vidament M. 2005.** French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89: 115-136.
64. **Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M, Palmer E. 2000.** Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improves post thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54: 907-919.
65. **Vidament M, Vicent P, Martin FX, Magistrini M, Blebois E. 2008.** Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci (in Press)*.
66. **Vidament M, Vincent P, Yvon JM, Bruneau B, Martin FX. 2005.** Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asinine and equine. *Animal Reproduction Science* 89: 302-305.
67. **Viera RC, Arruda RP, Manzano A. 1985.** Inseminação intercornual de equideos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL. In: *Anais XXII Reunião da SBZ. Balneário Camboriu, SC: SBZ.*
68. **Watson PF. 1996.** Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim* 31: 135-140.