

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CRIOPRESERVADOS MEDIANTE DILUYENTES COMERCIALES

Evaluation of the Functional and Structural Integrity Cryopreserved Goat Sperm by Commercial Extender

Leonardo Hernández-Corredor¹; Armando Quintero-Moreno²; Omar Camargo-Rodríguez³ y Mauricio Rojas-López⁴

¹Profesor catedrático, MSc. U.F.P.S., Cúcuta-Colombia, Instructor SENA-Norte de Santander, estudiante de Doctorado en Ciencias Agrarias, LUZ. (Correspondencia: lhernandezc@sena.edu.co). ²Profesor Titular PhD, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad del Zulia (LUZ) Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A. Maracaibo-Venezuela. ³Profesor Asistente, PhD, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia. ⁴Profesor Titular, post PhD, Facultad de Medicina, Unidad de Citometría de Flujo. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia, U de A. Calle 70 No 52-21. Medellín-Colombia.

RESUMEN

Dos experimentos se realizaron para observar los efectos del método de extracción seminal: Electroeyaculador (EE) vs. Vagina Artificial (VA); el diluyente: lecitina de soya (LS), yema de huevo al 6% (YH), lecitina de soya (LS) con mínimo de glicerol (LSbG) y la raza: Alpina (A) vs. Saanen (S) sobre la calidad espermática en semen descongelado de caprino (*Capra hircus*). Se utilizó la combinación DiOC6 y PI para evaluar por Citometría de flujo la vitalidad espermática (V) y el daño mitocondrial (AM). Mediante el Análisis Computarizado de la Motilidad espermática (CASA) se valoró el movimiento espermático (MOT) y progresividad de los espermatozoides (PROG), además de evaluar la integridad de la membrana acrosomal (IMA) en muestras seminales de macho cabríos. En el primer experimento no se evidenciaron diferencias debidas al método de extracción seminal ni a los diluyentes utilizados ($P \geq 0,05$), sin embargo, en el segundo experimento el diluyente LS supera ($P \leq 0,05$) a YH en los parámetros estudiados, MOT (56,60 % Vs 39,66 %) y PROG (33,31 % Vs 17,72 %). El efecto raza (A Vs S) también se evidenció ($P \leq 0,05$), solo con el uso del diluyente LS (V: 28,78 Vs 62,97 %). Los resultados indican que la LS mostró una mayor protección de los espermatozoides caprinos frente al proceso de criopreservación, comparándolo con YH, del mismo modo, las muestras seminales de la raza S demostraron ser más resistentes a los procesos de criopreservación.

Palabras clave: Cabras; semen; citometría; diluyentes

ABSTRACT

Two experiments were conducted to observe the effects of seminal extraction method: electroejaculator (EE) Vs Artificial Vagina (VA); Diluent: soy lecithin (LS), egg yolk 6% (YH) soy lecithin with minimal glycerol (LSbG) and race: Alpina (A) Vs Saanen (S) on sperm thawed semen quality goat. DiOC6 and PI the combination was used to assess flow cytometric sperm vitality (V) and mitochondrial damage (AM). By computer analysis of sperm motility (CASA) sperm movement (MOT) and progressive sperm (PROG) was assessed, in addition to evaluating the integrity of the acrosome membrane (IMA) in semen samples from male goats. In the first experiment there were no differences due to seminal extraction method or diluents used ($p \geq 0.05$) showed. In the second experiment the diluent exceeds LS ($P \leq 0.05$) to YH in the parameters studied, MOT (56.60% vs. 39.66%) and PROG (33.31% vs. 17.72%). The race effect (A Vs S) was also evident ($P \leq 0.05$), only with the use of the diluent LS (V: 28.78 vs. 62.97%). The results indicate that the LS showed greater protection against goats sperm cryopreservation process, comparing YH, likewise, seminal samples S race proved more resistant to cryopreservation processes.

Key words: Goat; semen; citometry; extender

INTRODUCCIÓN

Desde hace unos años, la inseminación artificial caprina se ha difundido mundialmente, sin embargo, sus resultados son muy variables. Los espermatozoides tienden a sufrir daños y deterioros durante la dilución y preservación a las temperaturas bajas. Roy [56] describe como la criopreservación seminal caprina tiene inconveniente al utilizar la yema de huevo (YH), ya que, la glándula bulbo uretral aporta al plasma seminal una enzima fosfolipasa (EYCE) que coagula la (YH) al hidrolizar la lecitina de soya (LS), ocasionando un efecto tóxico para el espermatozoide caprino [20]. Autores como Purdy [51] y Leboeuf y col. [36], han mostrado que al realizar el lavado del semen caprino mejora la sobrevivencia espermática post descongelación. De esta forma, Cabrera y col. [11] concluyeron que el lavado del material seminal es necesario realizarlo cuando la concentración de la (YH) es mayor al 10 %. Por lo tanto se debe remover el plasma seminal en ésta especie, para incrementar motilidad y vitalidad espermática [6, 24, 26, 34,35, 46].

La deshidratación progresiva de los espermatozoides, la alta proporción de células con daño acrosomal, cambios en la distribución de enzimas en las membranas o diferencias en la estructura de la cromatina se pueden inducir en la criopreservación [39]. La vitalidad espermática después de la descongelación depende de muchos factores como: la técnica de congelación, la composición de los diluyentes, dilución, tiempos de congelación y método de descongelación [1], esto puede ser atribuido al estrés oxidativo por la producción de radicales libres [7], lo cual se incrementa al tener mayor número de espermios muertos en el semen, los cuales liberan radicales libres que modifican la función de la membrana de los espermatozoides vivos. Durante la fase de equilibrio, después de la adición del medio crioprotector, pero antes de la fase de congelación, las células inicialmente se deshidratan y disminuyen sutilmente sus dimensiones, lo cual es debido a que el agua fluye del compartimiento intracelular al medio extracelular, luego las células se rehidratan e incrementan sus dimensiones debido a la entrada del agua y el crioprotector al interior celular. Todo este mecanismo propicia a que los espermatozoides vivos se encogen al llegar al equilibrio osmótico, dando como resultado en daños morfológicos en la cola, afectando la motilidad, viabilidad y fertilidad de la célula espermática [2, 13, 32, 52, 60, 61].

Técnicas como la citometría de flujo he estado involucrada en estudios de biología, inmunología, oncología y desde hace un tiempo en la reproducción animal destacando el área de Espermiología. Este sistema permite evaluar un gran número de células (generalmente entre 10,000 células por muestra). Gracias a marcadores fluorescentes se puede conocer las características de cada célula, como su tamaño y complejidad, además de su estructura (superficie, citoplasma, mitocondria y núcleo); logrando obtener resultados con gran especificidad y sensibilidad [8]. La integridad de la membrana espermática en caprinos puede ser observada usando diferentes pruebas de

fluorescencia como: Diacetato de carboxyfluorescencia (CFDA) asociado a Yoduro de Propidium (PI: >620 nm) [59], SRBY-14 con PI, CARboxy-SNARF con PI [25, 42]. El PI emite fluorescencia roja cuando se asocia a los ácidos nucleicos del espermatozoide con la membrana celular dañada [10]. Para evaluar el daño mitocondrial varios autores han reportado diferentes tinciones como: JC-1 [41, 47, 50], Rhodamine 123 [17], Mito-Tracker Green FM (MITO), [14, 18, 21] y DiOC₆ [40]. Los estudios de Marchetti y col. [38] reportaron correlación (r: 0,48; P≤0,005) entre DiOC₆ y PI, por lo que es una de las tinciones más utilizados para monitorear los cambios mitocondriales. El acrosoma puede ser evaluado con lectinas, como la PNA (aglutinina de cacahuete de *Arachis hypogaea*) o PSA (aglutinina de *Pisum sativum*), al estar conjugado con tinciones fluorescentes como isotiocianato de fluoresceína (FITC) [22, 31, 45, 48, 49, 53]. La ausencia de la fluorescencia en el espermatozoide es un indicativo de un daño o reacción acrosomal y la fluorescencia es un indicativo de un cromosoma intacto [59].

El objetivo del presente estudio que se dividió en dos fases tuvo como fin evaluar los efectos del método de extracción seminal, de tres diluyentes comerciales y dos razas caprinas sobre integralidad estructural-funcional y la motilidad de los espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación. La integridad fue medida cuantificando los cambios derivados sobre la vitalidad, daño acrosomal y mitocondrial y la motilidad al cuantificar la progresión del movimiento espermático y motilidad total porcentual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Primer experimento. Se utilizaron 4 machos cabríos adultos mestizos, con edades entre los 15 y 36 meses (mes) de edad y de fertilidad conocida. Los animales fueron sometidos a un ritmo de recogidas de dos veces por semana (sem). En total se recolectaron 64 eyaculados (16 eyaculados por macho) durante un periodo experimental de tres mes. Empleando un electroeyaculador (EE) (Electroyac 5®, Neogen Corporation, Lexington, KY, EUA) durante las primeras 4 sem del estudio y una vagina artificial (VA) (MINITÜB, 11320, Tiefenbach, Alemania) durante otras 4 sem Las muestras fueron mantenidas en baño maría (modelo YCW-03S, Gemmy Industrial Corp., Taipei, Taiwan), a 37 °C hasta su valoración.

Evaluación y criopreservación de las muestras seminales

Inmediatamente tras la recogida de semen, muestras de esperma fueron evaluadas para determinar el volumen (mL), el pH mediante tiras reactivas, la motilidad masal (%) e individual (%), la concentración espermática (spz/mL y la morfología (%). Para la concentración se prepara una alícuota a dilución 1:200, con formalina al 10%, utilizando una cámara de recuento celular (Neubaüer®). A continuación se homogeneiza la muestra de esperma mediante oscilaciones cuidadosas y tras desechar las 5-10 primeras gotas, se llena la cámara por capilaridad.

Tras la evaluación rutinaria, se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos (min) (Centrifuga Dynac III®, Becton Dickinson, EUA). A continuación, se retiró el sobrenadante y el pellet de espermatozoides fue re-diluido en alícuotas para tres diluyentes, el primero contiene LS, citrato de sodio, fructosa y glicerol al 7%; el segundo consta de YH al 6%, Tris-citrato, fructosa, y glicerol al 6% y un tercer diluyente a base de LS con un porcentaje de 3,5% de glicerol (LSbG). Una vez diluidas hasta una concentración final aproximada de 100×10^6 de espermatozoides/mL, las muestras fueron refrigeradas a 4°C durante 2 horas (h), envasadas en pajuelas de 0,5 mL y selladas por ultrasonido con un equipo automático (MPP Quatro, Minitüb, Alemania) y refrigeradas (Equitainer I, Hamilton Research Inc., EUA) nuevamente a 4°C por 20 min. Finalmente, las pajuelas de cada tratamiento fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido, colocándolas a 4 centímetros (cm) de la superficie del nitrógeno, durante 15 min para seguidamente sumergirlas en nitrógeno líquido a -196°C.

Análisis de la vitalidad (V) y daño mitocondrial (DM)

Las muestras congeladas fueron transportadas al laboratorio de Citometría de flujo de la SUI de la Universidad de Antioquia (Colombia) en un tanque de nitrógeno líquido (Taylor-Wharton®, XTL3, 4075 Hamilton Blvd. Theodore, AL 36582), donde se procedió a realizar la valoración de los parámetros en el citómetro de flujo (BD FACSCanto II). Se evaluó un total de 50 pajuelas, previamente elegidas al azar y descongeladas en baño maría a 37°C durante 5 min. Para esta prueba se utilizó una doble tinción DiOC6/PI, en una alícuota de 250 μ L de semen (se preparó 1×10^6 células/mL) se mezcló con DiOC6 (Invitrogen, Eugene, OR) y yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich, Inc. 3050 Spruce Street St. Louis, MO 63103, EUA). Las suspensiones celulares se tñieron con 2,5 μ L de DiOC6 a una concentración de 4 μ M y 2,5 μ L de PI a una concentración de 50 μ g/mL (1:200). Las células se incubaron a 20°C 25 min a 37°C. La lectura se realizó inmediatamente en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton, Dickinson), con un láser de argón de longitud de onda de 488 nm. Los resultados fueron analizados usando el programa Flow Jo® V 10.0.

Análisis de la motilidad espermática

Para la valoración de la motilidad (MOT) y progresividad (PROG) se tomaron 5mL de semen y se colocaron en cámaras Leja® (Nieuw Vennepe, Holanda) de 20 μ . Posteriormente se capturaron los espermatozoides en movimiento en el microscopio (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda., Tokio, Japón) con objetivos de contraste de fases a 200X con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. La valoración de los parámetros cinéticos fue realizada mediante el sistema CASA (Sperm Class Analyzer (SCA® versión 2002, Microptic, Barcelona, España). Se evaluaron un total de 280 pajuelas, según la metodología descrita por Grajales y col. [23] para el macho cabrío, previamente elegidas al azar y descongeladas en baño maría (modelo YCW-03S. Taipei, Taiwan) a 37°C durante 5 min. En cada análisis, los campos microscópicos fueron aleatoriamente capturados en 2 gotas, empleando un microscopio de contraste de fases negativo

(Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda., Tokio, Japón) a 200 X. Por cada muestra de semen evaluado fueron tomados como mínimo 5 fotografías, contabilizándose como mínimo 1000 espermatozoides por muestra.

Segundo experimento. Se utilizaron 7 machos cabríos adultos mestizos, con edades entre los 12 y 36 mes de edad y de fertilidad conocida. Los animales fueron sometidos a un ritmo de recogidas 1 vez por semana. En total se recolectaron 56 eyaculados (8 eyaculados por macho) durante un periodo experimental de tres mes. Con vagina artificial (VA) (MINITÜB, 11320, Tiefenbach Alemania). Las muestras fueron diluidas 1:1 en Biladyl® (Fracción A) y mantenidas a 37°C hasta su valoración.

Las evaluaciones, la criopreservación de las muestras seminales junto con los análisis de la vitalidad, daño mitocondrial y motilidad espermática se hicieron con igual metodología del experimento uno. Solo que se utilizaron dos diluyentes del primer experimento: uno a base LS y otro de YH al 6%.

Integridad de la membrana Acrosomal (IMA). Una alícuota de (5 μ L) de semen de cada tratamiento fueron colocados en un portaobjetos y secados al aire y con un lavado de 2 mL de alcohol industrial (95 %), luego se le agrega 20 μ L de FITC-PNA (Sigma, L7381, lote #102M4102V, EUA) trabajando con una solución (100 μ g/mL) se incubó por un periodo de 20 min (en la oscuridad), luego se llevan para su evaluación a un microscopio de fluorescencia (X 1000, MVX10, Olympus, EUA) se realizó el conteo de 100 espermatozoides, los cuales fueron clasificados en intactos y reaccionados. Aquellos que se teñían de verde fluorescente tenían el acrosoma intacto (ACI) y como (ACR) acrosoma reaccionado cuando el verde fluorescente no estaba presente en la región de la cabeza, o cuando estaba presente en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide.

Análisis estadístico. Se aplicó un diseño Factorial (A*B), en el primer experimento se tiene en cuenta la forma de toma del semen y los diluyentes, en el segundo experimento se tiene en cuenta los diluyentes y la raza de los animales, los datos obtenidos fueron procesados mediante el procedimiento Lineal General (PROG GLM) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System Institute, versión 9.1, 2002). Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Motilidad y progresividad. En el primer experimento se observa que la motilidad y progresividad espermática postdescongelación presentan los mejores valores al utilizar VA que EE ($P \leq 0,05$), en los diluyentes LS y YH no existió diferencias significativas ($P \geq 0,05$), en el segundo experimento no existieron diferencias ($P \geq 0,05$) entre las razas de los animales y los diluyentes para la variable de motilidad, mientras que la variable progresividad la LS mostró mejores valores ($P \leq 0,05$) para las muestras refrigeradas a 2h (4°C). En el semen postdescongelado la LS evidencia mejores resultados ($P \leq 0,05$), la variable raza no muestra diferencias estadísticas ($P \geq 0,05$).

Daño mitocondrial y viabilidad. En la primera investigación se muestra como los daños mitocondriales se presentaron en los dos factores método de extracción y diluyentes ($P \geq 0,05$). Pero la viabilidad demuestra diferencias significativas ($P \leq 0,05$), para las muestras tomadas con EE y el diluyente YH. Para el segundo experimento el daño mitocondrial es menor con LS y los espermios de la raza Saanen ($P \leq 0,05$).

Integridad de la membrana acrosomal. En el segundo experimento no se evidencia daños en la membrana acrosomal en ninguno de los factores estudiados ($P \geq 0,05$).

En la FIG. 1 se observa la metodología usada para observar el tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de los espermatozoides y los controles para las tinciones.

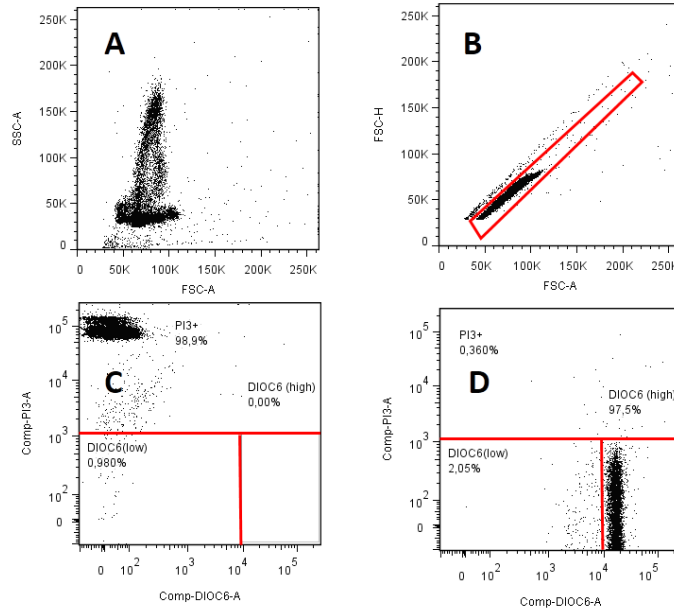


FIGURA 1. EJEMPLO DE LA ESTRATEGIA PARA LA MEDICIÓN DEL DAÑO MITOCONDRIAL DEBIDO AL CAMBIO EN EL ESTADO DE TRANSICIÓN ($\Delta\Psi_m$) CON DIOC₆ (700 NM) Y EL DAÑO EN LA MEMBRANA CELULAR CON PI (10 MG/ML) EN ESPERMATOZOIDES, EN EL PANEL (A) SE OBSERVA LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ACUERDO CON SU TAMAÑO (FSC) Y GRANULARIDAD (SSC). EN (B) LA ESTRATEGIA PARA EXCLUIR AGREGADOS CON LOS PARÁMETROS FSC-AREA Y FSC-HEIGHT. CON LOS CONTROLES POSITIVOS PARA PI (C) Y POSITIVOS PARA DIOC₆ (D).

**TABLA I
EFECTO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DILUYENTE SEMINAL SOBRE LA VITALIDAD ESPERMÁTICA Y DAÑO MITOCONDRIAL EN SEMEN POST DESCONGELADO DE CAPRINOS. (PRIMER EXPERIMENTO)**

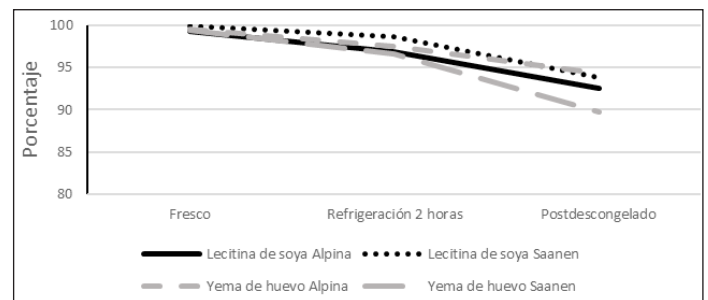
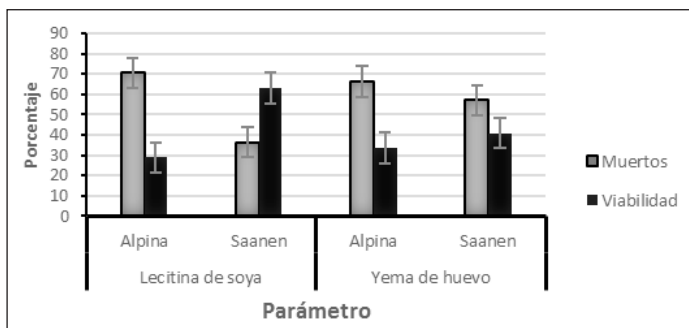
Método de extracción seminal	Diluyente	Parámetros medidos post.descongelación % (± EE)				
		Motilidad	Progresividad	Daño mitocondrial	Viabilidad	Coefficiente de Variación
Electroeyaculador	Lecitina de soya	15,34 ^b (±3,72)	5,00 ^b (±1,37)	96,0 ^a (±1,84)	0,035 ^a (±0,006)	40,30 ^a (±18,86)
	Yema de huevo	34,15 ^a (±6,28)	12,41 ^a (±2,82)	58,57 ^b (±10,43)	9,95 ^b (±0,006)	109 ^a (±14,33)
	LS (Bajo Glicerol)	11,55 ^b (±4,38)	3,69 ^b (±1,58)	95,65 ^a (±0,97)	0,09 ^a (±0,04)	75,98 ^a (±56,16)
	Total	20,35 ^A (±2,98)	7,03 ^A (±1,22)	83,40 ^A (±4,26)	3,36 ^B (±0,82)	75,14 ^A (±16,77)
Vagina Artificial	Lecitina de soya	55,07 ^a (±4,34)	21,42 ^a (±2,15)	84,25 ^a (±13,95)	0,09 ^a (±0,06)	126,0 ^a (±1,00)
	Yema de huevo	52,03 ^a (±6,82)	18,91 ^a (±3,56)	44,27 ^b (±11,11)	0,50 ^b (±0,21)	65,22 ^a (±13,10)
	LS (Bajo Glicerol)	36,97 ^b (±10,35)	11,83 ^a (±4,12)	86,37 ^a (±4,73)	0,06 ^a (±0,04)	52,10 ^a (±24,81)
	Total	47,41 ^B (±4,28)	16,01 ^B (±2,05)	71,63 ^A (±4,93)	0,21 ^A (±0,94)	81,10 ^A (±19,37)

(a, b; A, B): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

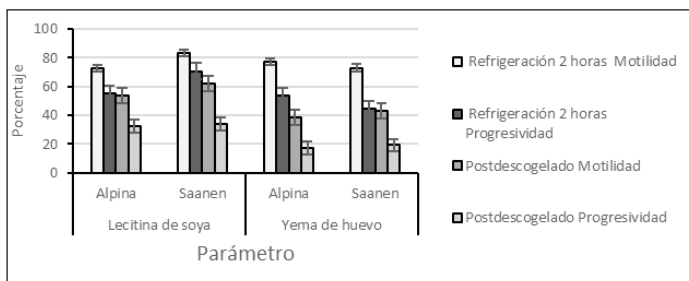
TABLA II
EFFECTO DE DILUYENTE SEMINAL Y LA RAZA EN LA VITALIDAD ESPERMÁTICA Y DAÑO MITOCONDRIAL (SEGUNDO EXPERIMENTO)

Diluyente	Raza	Parámetros medidos								
		Semen fresco (%) (± EE)		Refrigeración a 2 horas (%) (± EE)		Postdescongelados (%) (± EE)		Integridad espermática (%)		
		Motilidad	Progresividad	Motilidad	Progresividad	Motilidad	Progresividad	Daño mitocondrial	Viabilidad	Coefficiente de Variación
PBS	Alpino	79,10 ^a (±4,12)	61,76 ^a (±4,77)							
	Saenen	75,09 ^b (±8,03)	62,62 ^a (±7,37)							
Lecitina de soya	Alpina			72,58 ^a (±5,77)	55,05 ^a (±6,58)	53,44 ^a (±3,76)	32,77 ^a (±3,00)	68,64 ^a (±7,83)	17,58 ^a (±2,38)	96,96 ^a (±6,07)
	Saenen			83,06 ^a (±6,28)	70,75 ^b (±8,20)	62,20 ^a (±3,99)	34,28 ^a (±3,47)	35,25 ^b (±9,89)	20,16 ^a (±1,89)	84,65 ^a (±6,11)
	Total			76,32 ^A (±4,37)	60,66 ^A (±5,25)	56,60 ^A (±2,82)	33,31 ^A (±2,28)	51,94 ^A (±5,24)	18,87 ^A (±1,79)	90,79 ^A (±4,35)
Yema de huevo	Alpina			77,16 ^a (±6,80)	53,61 ^a (±6,95)	38,27 ^a (±2,84)	17,05 ^a (±1,57)	61,57 ^a (±4,91)	18,16 ^a (±2,19)	110,21 ^b (±6,28)
	Saenen			72,91 ^a (±9,15)	44,49 ^b (±10,26)	42,81 ^a (±3,46)	19,22 ^a (±3,46)	55,49 ^a (±6,50)	20,73 ^a (±3,63)	115,05 ^b (±5,94)
	Total			75,63 ^A (±5,36)	50,33 ^B (±5,72)	39,66 ^B (±2,24)	17,72 ^B (±1,25)	58,53 ^A (±5,27)	19,46 ^A (±1,80)	112,63 ^B (±4,38)

(a, b; A, B): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).



(A)



(B)

(C)

FIGURA 2. A. MORTALIDAD Y VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES Y LA INTERACCIÓN ENTRE SUS DILUYENTES Y LA RAZA (EXPERIMENTO 2), B. MOTILIDAD Y PROGRESIVIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES A REFRIGERACIÓN POR 2 HORAS (4°C) Y POSTDESCONGELACIÓN, C. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSÓMICA (FICT-PNA).

TABLA III
INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ACROSOMAL

Diluyente	Raza	Parámetro M (%) (\pm EE)		
		Fresco	2 horas	Postdescongelado
Lecitina de soya	Alpina	99,26 ^a \pm (0,96)	96,86 ^a \pm (2,44)	92,53 ^a \pm (1,35)
	Saanen	99,90 ^a \pm (0,30)	98,63 ^a (\pm 1,68)	93,81 ^a (\pm 1,57)
	Total	99,53 ^A \pm (0,81)	97,61 ^A \pm (2,29)	93,17 ^A \pm (1,03)
Yema de huevo	Alpina	99,53 ^a \pm (0,83)	97,46 ^a \pm (2,35)	94,26 ^a \pm (1,35)
	Saanen	99,44 ^a \pm (0,88)	96,66 ^a \pm (2,44)	89,77 ^a \pm (1,74)
	Total	99,50 ^A \pm (0,83)	97,16 ^A \pm (2,37)	92,10 ^A \pm (1,10)

(a, b; A, B): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Es el primer trabajo donde se valora parámetros de viabilidad, actividad mitocondrial y mortalidad espermática por medio de tinciones como DiOC6 y PI comparando el método de extracción seminal y el efecto de tres diluyentes (primer experimento), donde el mejor método colecta seminal fue vagina artificial, junto con los medios LS y YH, el efecto del EE se ve marcado en la MOT (EE: 20,35 \pm 2,98 % Vs VA: 47,41 \pm 4,28 %) y Progresividad. En éste experimento el centrifugado se hizo directamente con los medios de congelación (1:1), extrayendo el plasma seminal. Es importante comentar que este manejo induce una disminución en la actividad antioxidante e incremento de los ROS, lo cual contribuye a la generación de sustancias tóxicas que causan daño de integridad acrosomal y mitocondrial afectando el ADN, disminuyendo la viabilidad espermática, según lo expuesto por Aitken y Kopper [3], Ferreira y col. [19] y Ledesma y col. [37]. Eso podría explicar los resultados obtenidos con ambos métodos al evaluar el daño mitocondrial (EE: 83,40 \pm 4,26 % Vs VA: 71,63 \pm 4,93 %).

Al observar los resultados de citometría se tiene en cuenta el índice de fluorescencia (MFI) y el coeficiente de variación (CV). Cambios en la MFI, pueden indicar algún efecto, lo mismo que incrementos en el CV. Éstos pueden ser interpretados como variaciones en la captación del DiOC6 que pueden ser debidas a disfunción mitocondrial. Incrementos en la captación del DiOC6 se asocian con estrés oxidativo o con hiperpolarización mitocondrial como se observó en estos espermatozoides caso igual fue reportado por Yang y col. [62].

En el segundo experimento, se trabajó con VA y la toma seminal se hizo con un diluyente sin glicerol (Biladyl® A) 1:1, el diluyente LS mostró espermatozoides con mejor viabilidad, motilidad y progresividad, los daños mitocondriales en éste experimento a pesar de ser significativos, mejoran por lo que se evidencia que el problema deriva de la toxicidad al glicerol en los espermatozoides del primer experimento, que tenían el desde la toma contacto con criopreservante [5]. Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos por Sariözkan y col. [58] y Roof y col. [55] corroborando que la composición de diluyente es crucial para la protección de los espermatozoides contra la criopreservación [27]. Bathgate y col. [9]. Demostraron que, a medida que aumenta el porcentaje de yema de huevo en los

diluyentes para caprinos, decrece la motilidad y la viabilidad. Los cambios estructurales que suceden en el proceso de criopreservación, a nivel celular causan daños irreversibles en los espermatozoides y afectan la motilidad [15, 16]. Según Krishnakumara y col. [33] concluyeron que el uso de un medio diluyente libre de proteína animal (LS), presenta mejor respuesta dado a que su contenido de fosfolípidos es derivado a partir de extracto de soya. Sus lipoproteínas de baja densidad son mediadas por la colina [57], protegiendo a la célula espermática durante la criopreservación, otro mecanismo de la lecitina es la capa que forma sobre la superficie de la membrana espermática para evitar los daños de los cristales de hielo [44], sustituyendo algunos fosfolípidos en la membrana de este modo disminuye la fase transición en el momento de la criopreservación.

Con relación a los parámetros de esperma evaluados por citometría de flujo en el presente estudio, los valores más altos de espermatozoides vivos ($P \geq 0,05$) y con mitocondrias activas ($P \geq 0,05$) se encontraron en muestras criopreservadas en el diluyente YH, pero hay que tener en cuenta los altos CV ($P \leq 0,03$) encontrando resultados diferentes a los reportados por Jimenez-Rabayan y col. [28].

Sin embargo, el mecanismo por el cual el glicerol y YH podrían reducir la integridad de la membrana acrosomal queda por esclarecer. Sin embargo se podría sugerir que, el tiempo de incubación los espermatozoides con este diluyente antes de la congelación podrían desempeñar gran parte del aumento en el porcentaje de espermatozoides sometidos a la reacción acrosomal, resultando después de la descongelación una alta proporción de daño en la membrana del acrosoma.

Otra particularidad del segundo experimento tiene que ver con el efecto raza donde los machos de la raza Saanen (S), supera a los alpinos (A) en los parámetros evaluados ($P \leq 0,05$). Chandler y col. [12] encontraron diferencias espermáticas (volumen, progresividad, concentración y anormalidades) entre la raza A y S. mostrando que los animales S fueron superiores, Karagiannidis y col. [30] evaluaron la motilidad espermática con valores de 59,8 y 64,4 %, para A y S respectivamente. Zamfirescu y Nadolu [63]; compararon las dos razas y obtuvieron motilidades postdescongelación de 46,34 y 56,12 %. Kamal y col. [29]

encontraron diferencias espermáticas entre las razas Saanen y Nubiana, presentando similitud a los datos obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, hay muy poca la información sobre la fisiología del plasma seminal, no se sabe si la fructosa, el ácido cítrico o la actividad de la fosfatasa alcalina es afectada por la condición racial como sucede en los estudios de Ali y Mustafa.; [4], Mendoza y col. [43], Roca y col. [54] y Zamiri y Heidaari, [64].

En conclusión la LS es un buen medio de criopreservación, al observar la viabilidad, integridad de la membrana, la integridad mitocondrial, la motilidad y la progresividad para la congelación de semen caprino. Sin embargo, es necesario evaluar antioxidantes con el fin de mejorar la efectividad en el proceso de criopreservación de espermatozoides caprinos para ser incorporados en programas de inseminación artificial o para la conservación en bancos de germoplasma. Resultados del presente estudio contribuyen a la estandarización y al proceso de evaluación de semen en la especie caprina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABOAGLA, E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenol.** 62(6): 1160-1172. 2004.
- [2] AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E.; LIU, J.; CRITSER, J. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars, **Biol. Reprod.** 67: 1493-1501. 2002.
- [3] AITKEN, R.; KOPPERS, A. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. **Asian J. Androl.** 13, 36-42. 2011.
- [4] ALI, B.; MUSTAFA, A. Semen characteristics of Nubian goat in Sudan. **Anim. Reprod. Sci.** 12: 63-68. 1986.
- [5] ANAKKUL, N.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T.; PHUTIKANIT, N.; SINGLOR J.; M. Glycerol Concentration Effects on Quality and Longevity of Post-thaw Goat Semen. **Thai J. Vet. Med.** 43: 179-186. 2013.
- [6] ARI, C.; DASKIN, A. Freezing of washed Angora goat semen with extenders added bull or ram seminal plasma. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.** 16, 233-239. 2010.
- [7] BARBAROS, P., TASDEMIR, U.; BUYUKLEBLEBICI, S.; ORGURTAS, T.; COSJUN, E.; EROL, H.; NURI, F.; SAFA, I. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. **Small Rum. Res.** 113: 383-389. 2013.
- [8] BARRERA, L., M., DRAGO, J., PEREZ, A., ZAMORA, F., ARROYO, T., SAINZ, F., MENDOZA. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. **Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.** 17 (1): 42-55.
- [9] BATHGATE, R.; MACE, N.; HEASMAN, K.; EVANS, G.; MAXWELL, W.; DE GRAAF, F. Birth of Kids After Artificial Insemination with Sex-Sorted, Frozen-Thawed Goat Spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.** 48(6):893-898. 2013.
- [10] BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reprod. Domest. Anim.** 43: 189-195. 2008.
- [11] CABRERA, F.; GONZALEZ, F.; BATISTA, M.; CALERO, P.; MEDRANO, A.; GRACIA, A. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). **Reprod. Domest. Anim.** 40:191-5. 2005.
- [12] CHANDLER, J.; PAINTER, C.; ADKISON, R.; MEMON, M.; HOYT, P. Semen Quality Characteristics of Dairy Goats. **J. Dairy Sci.** 71: 1638-1646. 1988.
- [13] CORREA, L.; THOMAS, A.; MEYERS, S. The Macaque Sperm Actin Cytoskeleton Reorganizes in Response to Osmotic Stress and Contributes to Morphological Defects and Decreased Motility. **Biol. Reprod.** 77:942-953. 2007.
- [14] DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.; CARMONA, M.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J. Suitability of novel antioxidants for protecting thawed spermatozoa from red deer. **Theriogenol.** 72: 1073-1084. 2009.
- [15] DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Anim. Reprod. Sci.** 112: 150-157. 2009.
- [16] DUBEIBE, D.; PINZÓN, B.; SALAZAR, P.; SERRANO, C. Comparación de dos diluyentes para el congelamiento de semen caprino de la raza santandereana. **Rev. Col. Cien. Pec.** 20: 4-535. 2007.
- [17] EVENSON, D.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **J. Histoch. Cytoch.** 30: 279-280. 1982.
- [18] FATEHI, A.; BEVERS, M.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J. Androl.** 27: 176-188. 2006.
- [19] FERREIRA, V.; BOURG, M.; MOREIRA, C.; FERREIRA, A.; MACHADO, J.; BARBOSA, R.; PEREIRA, W. Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. **Rev. Bras. Zoot.** 43(10):513-518. 2014.

- [20] GACITUA, H.; ARAV, A. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. **Theriogenol.** 63: 931–8. 2005.
- [21] GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J.; RAMÓN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; ESTESO, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; SOLER, A. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection. **Theriogenol.** 72:160–168. 2009.
- [22] GRAHAM, J.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol. Reprod.** 43:55–64. 1990.
- [23] GRAJALES, H.; TOVIO, N.; DUICA, A. Manejo y Control Reproductivo. **Guía Técnica de Producción Ovino Caprina III.** Primera Ed. Bogotá. 77pp. 2011.
- [24] GRAVANCE, C.; CHAMPION, Z.; CASEY, P. 1998. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. **Theriogenol** 49: 1219–1230. 1998.
- [25] GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenol.** 63: 445–457. 2005.
- [26] HERNÁNDEZ-CORREDOR, L.; NIVIA-OSUNA, A.; HERNÁNDEZ-VILLAMIZAR, D.; RUBIO-PARADA, J.; QUINTERO-MORENO, A. Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. **Rev. Respuesta UFPS,** 02: 15-26. 2013.
- [27] JIMÉNEZ-RABADÁN P.; MORRELL, J.; JOHANNISSON, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ALVARO-GARCÍA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; GARDE, J.; SOLER, A. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. **Anim. Reprod.Sci.** 136 (1-2):47-54. 2012.
- [28] JIMÉNEZ-RABADÁN P.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ALVARO-GARCÍA, P.; DEL OLMO, E.; PÉREZ-GUZMÁN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; SOLER, A. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. **Cryobiol.** 67: 251–257. 2013.
- [29] KAMAL, A.; GUBARTALLAH, A.; AHMED, A.; BAKHIET, O.; BABIKER, A. Comparative studies on reproductive performance of Nubian and Saanen bucks under the climatic conditions of Khartoum. **J. Anim. Vet. Adv.** (11): 942-944. 2005.
- [30] KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. **Theriogenol.** 53: 1285-1293. 2000.
- [31] KAWAKAMI, E.; MORITA, T.; TSUTSUI, T. Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. **J. Vet. Med. Sci.** 64:543–549. 2002.
- [32] KIM, S.; AGCA, C.; AGCA, Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. **Reprod. Ferti. Dev.** 25(7): 1051–1064. 2013.
- [33] KRISHNAKUMARA, S.; WHITESIDE, D.; ELKIN, B.; THUNDATHILA, J. Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*) **Theriogenol.** 76: 252–260. 2011
- [34] KONYALI, C.; TOMAS, C.; BLANCH, E.; GOMEZ, E.; GRAHAM, J.; MOCE, E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol- loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. **Cryobiol.** On Line: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.001>. 2013. Consultado: 19 de septiembre 2015.
- [35] KOZDROWSKI R.; DUBIEL, A.; BIELAS, W.; DZIĘCIOŁ, M.; Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of Computer-Assisted Semen Analysis System. **Acta.Vet. Brno.** 76: 601-604. 2007.
- [36] LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci** 62:113– 41. 2000.
- [37] LEDESMA, A.; MANES, J.; CESARI, A.; ALBERIO, R.; HOZBOR, F. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams. **Reprod. Dom. Anim.** 49: 324–332. 2014.
- [38] MARCHETTI, C.; OBERT, G.; DEFFOZEZ, A.; FORMSTECHE, P.; MARCHETTI, P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. **Hum. Reprod.** 17:1257– 65. 2002.
- [39] MARTI, J.; APARICIO, I.; GARCIA-HERREROS, M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenol.** 75: 473–481. 2011.
- [40] MARTIN, G.; CAGNON, N.; SABIDO, O.; SION, B.; GRIZARD, G.; DURAND, P.; LEVY, R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Hum. Reprod.** 22: 380–388. 2007.

- [41] MARTÍNEZ-PASTOR, F.; JOHNNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.** 84: 121–133. 2004.
- [42] MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. **Reprod. Dom. Anim.** 45 (2): 67–78. 2010.
- [43] MENDOZA, G.; WHITE, I.; CHOW, P. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenol.** 32:455–466. 1989.
- [44] MOUSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. **Theriogenol.** 57: 1695-1706. 2002.
- [45] NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.; GADELLA, B. A triple stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol.Reprod** 68: 1828–1835. 2003.
- [46] NOR-ASHIKIN, M.; ABDULLAH, R. Comparison between Tris-citric acid yolk, yolk albumin citrate and skimmed milk extenders on sperm motility, livability and mass movement in frozen-thawed goat sperm. **Biomedical. Res.** 22 (3): 285-288. 2011.
- [47] ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MACIAS-GARCIA, B.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO-RODRÍGUEZ, A.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.; PENA, F. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. **Biol. Reprod.** 81: 1106–1111. 2009.
- [48] PARTYKA, A.; NIZANSKI, W.; ŁUKASZEWICZ, E. Evaluation of fresh and frozenthawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenol.** 74: 1019–1027. 2010.
- [49] PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. **J. Reprod. Fertil** 57(3): 371–376. 2001.
- [50] PEÑA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS-GARCÍA B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reprod. Dom. Anim** 44: 345–349. 2009.
- [51] PURDY, P. A review on goat sperm cryopreservation. **Small. Rum. Res.** 63:215–25. 2006.
- [52] QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenol.** 59: 1973-1990. 2003.
- [53] RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. **Theriogenol.** 64: 706–719. 2005.
- [54] ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.; VÁSQUEZ, J. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of murciano-granadina goats. **Small. Rum. Res.** 10: 219-226. 1993.
- [55] ROOF, D.; BOWLEY, S.; PRICE, L.; MATSAS, D. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenol.** 77: 412–420. 2012.
- [56] ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature.** 179: 318-319. 1957.
- [57] SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiol.** 68: 276-280. 2014.
- [58] SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.; TUNCER, P.; TASDEMIR, U.; KINET, H.; ULUTAS, P. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. **Theriogenol.** 73: 316 –23. 2010.
- [59] SILVA, P.; GADELLA, B. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenol.** 65: 958–978. 2006
- [60] SILVESTRE, F.; BEZERRA, T.; CASTELO, A.; OLIVEIRA, R.; LIMA, G.; PEIXOTO, G.; BEZERRA, A., SILVA, A. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. **Cryobiol.** 63: 263–266. 2011.
- [61] TULI, R.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenol.** 2 (3): 547-555. 1994.
- [62] YANG, S.; WANG, T.; WEN, D.; HOUB, J.; LI, H. Protective effect of *Rhodiola rosea* polysaccharides on cryopreserved boar sperm. **Carbohydrate. Polym.** 135: 44–47. 2016.
- [63] ZAMFIRESCU, S.; NADOLU, D. The influence of the glycerol level upon the freezing pretability of Saanen and Alpine bucks semen. **Seria. Zootehnie** Vol. 52. 2005
- [64] ZAMIRI, M.; HEIDARI, A. Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. **Anim. Reprod. Sci** 96: 176–185. 2006



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXVII, N° 1 _____

Esta revista fue editada en formato digital y publicada en febrero de 2017, por el Fondo Editorial Serbiluz, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve