

# CRIOPROCESADO DE SEMEN OVINO: EFECTO SOBRE EL PATRÓN DE MOTILIDAD Y LA DISTRIBUCIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS.

## CRYOPROCESSING OF RAM SEMEN: EFFECT ON THE PATTERN OF MOTILITY AND THE DISTRIBUTION OF SPERM SUBPOPULATIONS.

JORGE RUBIO-GUILLÉN<sup>1\*</sup>, AMMARIE DÍAZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, CARLA OSORIO-MELÉNDEZ<sup>1</sup>,  
DECIO GONZÁLEZ-VILLALOBOS<sup>1</sup>, ARMANDO QUINTERO-MORENO.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (FCV-LUZ). Apdo. 15252. 4005-A. Maracaibo, Venezuela.

<sup>2</sup>Estudiante de pregrado Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (FCV-LUZ). Apdo. 15252. 4005-A. Maracaibo, Venezuela..

La correspondencia debe dirigirse a (Correspondence should be addressed to): J. Rubio-Guillen; E-mail: jorgeluis.rubio@gmail.com

### RESUMEN

La incorporación de computadoras (CASA) a la evaluación de la calidad seminal ha hecho posible el establecimiento de métodos de valoración de la motilidad espermática en forma objetiva, sin el juicio discrecional de un operador. Con el fin de determinar el efecto del proceso de criopreservación sobre el patrón de motilidad espermática, se evaluaron 5 eyaculados por morueco, en tres momentos: a la colecta, luego de la refrigeración a 5°C y luego del descongelado, pertenecientes al Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) en Zulia, Venezuela. El análisis computarizado de la motilidad espermática (CASA) fue realizado para cuantificar la progresividad de movimiento de los espermatozoides. El procedimiento FASTCLUS se utilizó para identificar las subpoblaciones y su distribución porcentual en semen recién colectado, refrigerado y descongelado (Chi cuadrado). El efecto directo de la criopreservación sobre las variables dependientes fue analizado con el procedimiento GLM (SAS®) y cuando se observaron diferencias se cuantificaron los efectos mediante el LSMEANS. Todos los valores de calidad espermática estudiados fueron afectados significativamente ( $P < 0,001$ ) por la criopreservación (progresividad y subpoblaciones). Los espermatozoides tuvieron significativamente ( $P < 0,001$ ) menor motilidad en semen refrigerado/criopreservado que en fresco para todos los ovinos. Fue posible identificar 4 grupos (o subpoblaciones) de motilidad diferentes ( $P < 0,001$ ) que coexisten (o coexistiendo) en el eyaculado. En conclusión, el presente estudio confirma que la criopreservación afecta la célula espermática de manera importante, comprometiendo los valores referenciales que cuantifican la calidad seminal, sobretudo el movimiento espermático.

**Palabras clave:** criopreservación, motilidad, calidad espermática, subpoblaciones espermáticas, ovinos.

JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2021) 6(1):19-28

### ABSTRACT

Computerized evaluation of seminal quality parameters (CASA) has made it possible to establish objective methods for assessing sperm motility without the subjective judgment of the operator. With the aim of evaluating objectively the effects of sperm cryopreservation process on spermatic motility and sperm distribution into subpopulations according to motility, as well as on the changes in sperm during cryoprocessing, five ejaculates, five refrigerated samples (5°C) and five frozen straws (-196°C) per ram/session were evaluated. Rams belonged to the Experimental Center for Animal Production (CEPA) in Zulia, Venezuela. Computerized analyses of sperm motility (CASA) were performed to quantify sperm progressive movement. FASTCLUS procedure was used to identify subpopulations. These data were analyzed using the GLM procedure (SAS®), and when significant differences were observed, effects were quantified using the LSMEANS statement. All values of sperm quality were significantly affected ( $P < 0.001$ ) by cryopreservation (progressivity and subpopulations). Spermatozoa were significantly ( $P < 0.001$ ) with less motility in cooled/cryopreserved semen than those in fresh semen for all rams. It was possible to identify four sperm subpopulations with different motility characteristics ( $P < 0.001$ ) that coexist in the ejaculate. In conclusion, the present study confirms that cryopreservation affects the sperm cell significantly, compromising semen quality, especially sperm movement.

**Keywords:** cryopreservation, motility, sperm quality, sperm subpopulations, rams

JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2021) 6(1):19-28

Received/Recibido: 26/06/2020; Accepted/Aceptado: 27/03/2021

Copyright: © 2021 Rubio-Guillén et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited / Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la [Licencia Creative Commons Attribution](#), la cual permite el uso irrestricto, la distribución y reproducción en cualquier medio, dando el crédito correspondiente al autor y la fuente original.



## INTRODUCCIÓN

Los ovinos resultan una especie que en Venezuela tiene un gran potencial socioeconómico, ya que se podrían establecer sistemas de producción exitosos en ecosistemas poco útiles para la crianza de bovinos, obteniendo buenos índices en producción de carne. Sin embargo, a pesar de las ventajas comparativas que tienen los pequeños rumiantes y la diversidad de ambientes a los cuales ellos se adaptan, la disponibilidad de información de índole andrológico es escasa si los comparamos con especies tradicionales como los vacunos, bufalinos o porcinos (Yániz et al., 2015).

En zonas tropicales su cría se ha destinado a pequeños productores, en condiciones extensivas, en donde el uso de la tecnología es casi nula, solo reportándose en el ámbito científico nacional algunos hallazgos sobre calidad seminal de reproductores utilizados para Inseminación Artificial (IA) (Rubio-Guillén et al., 2012).

En este mismo orden de ideas, y con miras a evaluar objetivamente una muestra seminal también se puede incluir la evaluación computarizada de la motilidad espermática (Quintero-Moreno, 2003). Hoy día, la inserción de computadoras al análisis facilita la evaluación de un gran número de espermatozoides en escasos minutos.

La comunidad científica internacional opina que, a pesar de estas imprecisiones, la valoración visual ofrece una descripción oportuna de la motilidad espermática, aunque dicha exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador. En todo caso, la valoración visual de una muestra de semen es todavía utilizada por la mayoría de los laboratorios y/o centros de inseminación artificial; a sabiendas de la subjetividad aparente de la valoración visual derivando en resultados contrastantes para una misma muestra entre diferentes laboratorios e incluso entre los distintos observadores de un mismo laboratorio (Rodríguez-Martínez, 2003).

De lo antes expuesto, se connota la necesidad de implementar una nueva metodología, más objetiva y que sea capaz de realizar la valoración de la motilidad espermática de una manera más efectiva. La aplicación de los conocimientos de la biología espermática al campo de la informática originó una serie de programas computarizados o “software” que describen la cinética e hidrodinámica seminal. Creando la necesidad de formular un análisis de la calidad espermática más objetivo, denominado genéricamente “CASA” (*Computer-Assisted Sperm Analysis*).

En este ensayo, se pretende analizar si existe una relación estrecha entre las características fisiológicas de espermatozoides criopreservados de ovinos y los resultados de las pruebas que valoran la calidad seminal, con miras a determinar: **a.** Comparar los descriptores de motilidad espermática a través del software CASA en semen fresco, refrigerado y descongelado de ovinos, determinando el efecto deletéreo de la criopreservación. **b.** Determinar subpoblaciones espermáticas móviles presentes a través del software CASA en semen fresco, refrigerado y descongelado de ovinos y comparar sus frecuencias en función del efecto de la criopreservación. **c.** Determinar si existen pruebas de calidad seminal que expliquen mejor la fisiología y función espermática como para clasificar las muestras seminales en función de los resultados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación y caracterización del área experimental

El estudio fue realizado en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA-LUZ), ubicado en el “Km 25” en la vía a Perijá, del municipio Cañada de Urdaneta (Estado Zulia). Zona agroecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, a 80 msnm y posee una temperatura anual entre 29,5 y 34°C (Ewel et al., 1968).

### Colección y procesamiento del semen

Los eyaculados fueron colectados mediante vagina artificial atemperada a 39°C, durante cinco (5) semanas consecutivas. Se obtuvieron un total de 25 repeticiones de los cinco (5) ovejoes reproductores adultos (5 x 5). Después de la evaluación seminal de rutina (Motilidad masal e individual, y concentración), las muestras clasificadas como idóneas para congelar (concentración mayor a 600 millones x mL, motilidad individual mayor al 70% y motilidad masal mayor de 3) fueron diluidas con una metodología de congelación a un paso, agregando el triladyl y la yema de huevo, sin usar una solución A (sin glicerol) y solución B (con glicerol), mezclando el semen con una solución madre con 20% de yema de huevo, 60% de agua estéril bidestilada y 20% del diluyente comercial Triladyl®.

El primer diluyente crioprotector utilizado contenía yema de huevos frescos de gallinas criollas. El 60% de agua estéril fue tomada de diluentes bidestilados usados para vacunas comerciales en el Centro Experimental. El segundo crioprotector utilizado era en base de glicerol de origen alemán recomendado para la congelación de semen de rumiantes menores, Triladyl<sup>®</sup> al 20%. Se homogenizaba lentamente en baño maría termoestable a 38°C. Luego de mezclado el semen con esta solución madre crioprotectora se efectuaba el llenado artesanal de las minipajuelas de 0,25mL. Posterior a este tiempo, se procedía a estabilizar las muestras seminales envasadas a 5°C durante un mínimo de dos (2) horas y un máximo de tres (3). Al culminar esta estabilización seminal, las minipajuelas fueron congeladas por lotes, en cavas de anime que contenían nitrógeno líquido (NL) en un proceso que constaba de dos pasos. Primeramente, se estabilizaron por 10 minutos en vapores de NL a 5 cm por encima de la superficie y posteriormente se sumergieron en el NL a -196°C y se almacenaron en un termo-tanque (MVE<sup>®</sup>, Millenium).

## ANÁLISIS DEL SEMEN FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO

### Motilidad espermática mediante programa computarizado (CASA)

El análisis se realizó mediante alícuotas seminales previamente diluidas en solución salina fisiológica (308mOsm/L) 1:400 (semen recién colectado) o no diluidos (semen refrigerado y descongelado) colocadas a 38°C durante 2 min en baño María termoestable (modelo YCW-OSS K), luego se tomaba 5 µL y se colocaban en un portaobjeto atemperado y se cubría con un portaobjeto de 20 mm<sup>2</sup>. Posteriormente, se capturaban los espermatozoides en movimiento en un microscopio de contraste de fases a 200X de aumento con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. Este análisis fragmenta la motilidad espermática en siete (7) parámetros que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento y desplazamiento espermático (Ver Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Parámetros cinéticos del CASA usados en este experimento

Parámetro	Definición	Unidad
Velocidad rectilínea (VSL)	Es la velocidad del espermatozoide sobre una línea recta entre su posición detectada por primera vez y la última posición.	µm/s
Velocidad curvilínea (VCL)	Es la velocidad calculada sobre el camino real del espermatozoide entre dos puntos de su trayectoria, expresada en micrones por segundo. Describe la motilidad real.	µm/s
Velocidad media (VAP)	Es la velocidad promedio del espermatozoide sobre el camino real del espermatozoide.	µm/s
Linealidad (LIN)	Es el porcentaje de linealidad de la trayectoria (VSL / VCL).	%
Amplitud lateral de la cabeza (ALH)	Es la magnitud del desplazamiento lateral de una cabeza de espermatozoides sobre su trayectoria promedio espacial.	µm/s
Frecuencia de batido (BCF)	Es la frecuencia de cruces o promedio de la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea cruzando la trayectoria promedio.	Hz
Rectitud (STR)	Es el porcentaje de rectitud o linealidad de la trayectoria promedio (VSL / VAP).	%

Este análisis computarizado también fragmenta la motilidad en dos (2) categorías, la primera se subdivide en espermatozoides móviles progresivos, móviles no progresivos y estáticos, mientras que la segunda categoría agrupa los espermios según su velocidad en rápidos, medios, lentos y estáticos. Este sistema CASA consta de un microscopio Olympus BX41TF (Tokio, Japón) con contraste de fases conectado a una platina atemperada (Tokai Hit<sup>®</sup> CO., LTD. Modelo MATS-U55S, Serial 190144536. Shizuoka-ken, Japón) que permite mantener las muestras a 38 °C, una cámara de video (Basler<sup>®</sup> A312f, Serial DA00067801CCD, Ahrensburg, Alemania) conectada a un procesador Intel<sup>®</sup> Core Duo (California, EUA). El sistema CASA a utilizar está basado en el análisis de 16 imágenes fotografiadas y digitalizadas, tomadas en un lapso de 0,64 segundos, lo cual implica un tiempo de captura de imágenes de 40 milisegundos.

### Análisis estadístico

Todos los datos grabados fueron analizados por SAS/Statistical Analysis System software 8.2, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. USA. 2002), sin tomarse en cuenta el efecto raza. La Normalidad de los datos fue evaluada por el estadístico de Shapiro-Wilk (W), incluido en el procedimiento UNIVARIADO. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para cuantificar el efecto de la criopreservación (fresco *vs.* refrigerado *vs.* descongelado) sobre las variables dependientes de motilidad, siendo expresados en valores porcentuales (%), y evaluadas a través del Modelo Lineal General del Análisis de la Varianza (Proc GLM) en varios eyaculados de cada ovejo. Cuando se encontraron

diferencias entre las medias, se cuantifico el efecto mediante el procedimiento de Diferencias Mínima Significativa (DMS) y la prueba Tukey (Modelo 1). El modelo matemático número uno (1) utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_{(i)} + \xi_{ijk}. \text{ Donde:}$$

$Y_{ijk}$  = Respuesta traducida en: parámetros de análisis de motilidad.

$\mu$  = Media general

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$  = fresco/refrigerado/descongelado).

$A(T)_{(i)}$  = Efecto del  $j$ -ésimo animal anidado dentro del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\xi_{ijk}$  = Error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2 \text{ DNI} \sim (0, \sigma^2 \text{ DNI})$ .

Del mismo modo y con el propósito de identificar la presencia de SP espermáticas en el eyaculado, mediante descriptores de motilidad, fueron sometidas las muestras a un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico (FASTCLUS), el cual agrupa a los espermatozoides según sus descriptores de motilidad, como se ha señalado anteriormente (Quintero-Moreno et al., 2003, 2004). Para cuantificar la relación entre la criopreservación y la frecuencia de distribución de los espermatozoides de cada subpoblación se analizaron los datos mediante la prueba Chi-cuadrado.

El modelo matemático número dos:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + TC_{ij} + \xi_{ijk}. \text{ Dónde:}$$

$Y_{ijk}$  = Respuesta traducida en: variables de motilidad espermática.

$\mu$  = Media general

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento ( $i$  = fresco/refrigerado/descongelado).

$C_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo grupo o subpoblación espermática ( $SP_1, SP_2, SP_3, SP_4$ ) previamente establecida.

$TC_{ij}$  = Efecto de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento con el  $j$ -ésimo grupo.

$\xi_{ijk}$  = Error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2 \text{ DNI} \sim (0, \sigma^2 \text{ DNI})$ .

## RESULTADOS

El presente estudio se realizó con la finalidad de determinar el efecto del criopreservamiento sobre la motilidad espermática evaluada mediante la técnica CASA, junto con el procedimiento de análisis Multivariado de la data, con la finalidad de caracterizar los eyaculados de reproductores ovinos en función de las variables de velocidad del movimiento de los espermatozoides. En este contexto, la Tabla 2, nos muestra la media y error estándar de los descriptores de motilidad espermática según la fase de procesamiento de los eyaculados. Se observa, diferencias ( $P < 0,001$ ) en todos los descriptores de velocidad y progresividad para los tres (3) tratamientos. En las velocidades rectilíneas, curvilíneas y promedio (VCL, VSL, VAP) hubo una disminución de al menos 12% por cada tratamiento recién colectado *vs.* Refrigerado *vs.* Descongelado para estas tres (3) variables, y en algunos casos el decremento fue hasta de un 20% (recién colectado *vs.* refrigerado), lo que demuestra el “estrés por frío” en las muestras cuando son pasadas de 38°C a la temperatura de estabilización (5°C por un mínimo de 2 horas), (Ver Cuadro 2).

Así mismo, en la Tabla 2, los tres (3) índices de desplazamiento frontal (Linealidad, rectitud y oscilación) también presentaron una reducción en sus porcentajes motivados al efecto tratamiento ( $P < 0,001$ ) para todos los casos, sin embargo, la disminución no pareciera ser tan marcada entre el paso de la temperatura de estabilización de 5°C (por dos horas) a la de congelación en nitrógeno líquido (-196°C) y su posterior descongelación. Esta transición termotrópica cercana al punto de congelación (entre 5°C y -5°C) también produjo una disminución entre la frecuencia de cruces o promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio, expresada en Hz (BCF), así como también, para el caso de desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH), ( $P < 0,001$ ).

**Cuadro 2. Media y error estándar de los descriptores de motilidad espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados**

Descriptor	TRATAMIENTO		
	Recién colectado	Refrigerado	Descongelado
VCL	89,27±0,16 <sup>a</sup>	69,94±0,20 <sup>b</sup>	45,45±0,18 <sup>c</sup>
VSL	43,58±0,10 <sup>a</sup>	26,47±0,12 <sup>b</sup>	18,74±0,11 <sup>c</sup>
VAP	62,60±0,12 <sup>a</sup>	42,16±0,14 <sup>b</sup>	28,45±0,13 <sup>c</sup>
LIN	47,73±0,08 <sup>a</sup>	38,29±0,10 <sup>c</sup>	40,91±0,09 <sup>b</sup>
STR	66,69±0,08 <sup>a</sup>	60,24±0,10 <sup>c</sup>	62,20±0,09 <sup>b</sup>
WOB	68,81±0,06 <sup>a</sup>	61,16±0,07 <sup>c</sup>	63,29±0,07 <sup>b</sup>
ALH	3,45±0,006 <sup>a</sup>	3,18±0,007 <sup>b</sup>	2,30±0,007 <sup>c</sup>
BCF	5,09±0,01 <sup>b</sup>	5,33±0,01 <sup>a</sup>	4,25±0,01 <sup>c</sup>

VCL: Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL= velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP= velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), LIN= índice de linealidad (%), STR= índice de rectitud (%), WOB= índice de oscilación (%), ALH= desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ) BCF= Frecuencia de la Batida de la Cabeza espermática (Hz). (a,b,c): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ( $P<0,001$ ).

De acuerdo con las características de motilidad y desplazamiento progresivo de un total de 184.427 espermatozoides, utilizando el análisis de agrupamiento (FASTCLUS), se identificaron cuatro (4) SP espermáticas. Las SP encontradas fueron caracterizadas a través de valores diferentes ( $P<0,001$ ) de motilidad espermática en ocho (8) descriptores objetivos de hidrodinámica de movimiento. En la Tabla 3, se muestran las SP1, SP2, SP3 y SP4 de mayor a menor en cuanto al cociente de linealidad (VSL/VCL) y oscilación (VAP/VCL).

**Cuadro 3. Parámetros de motilidad espermática de los ovinos en las muestras frescas, refrigeradas y descongeladas, y su distribución en subpoblaciones**

Descriptor de motilidad	Subpoblaciones espermáticas			
	SP <sub>1</sub>	SP <sub>2</sub>	SP <sub>3</sub>	SP <sub>4</sub>
VCL	145,96±28,16 <sup>a</sup>	73,62±20,47 <sup>c</sup>	34,54±17,70 <sup>d</sup>	117,30±27,88 <sup>b</sup>
VSL	92,88±26,97 <sup>a</sup>	46,06±14,83 <sup>b</sup>	11,44±6,62 <sup>d</sup>	31,56±13,07 <sup>c</sup>
VAP	113,37±23,62 <sup>a</sup>	55,65±16,03 <sup>c</sup>	20,09±10,14 <sup>d</sup>	66,22±19,13 <sup>b</sup>
LIN	65,23±18,61 <sup>a</sup>	64,16±15,68 <sup>b</sup>	35,95±19,33 <sup>c</sup>	27,04±9,78 <sup>d</sup>
STR	81,90±14,27 <sup>b</sup>	82,98±11,21 <sup>a</sup>	57,83±20,45 <sup>c</sup>	48,18±16,04 <sup>d</sup>
WOB	78,72±13,08 <sup>a</sup>	76,77±12,32 <sup>b</sup>	60,35±17,07 <sup>c</sup>	56,88±11,97 <sup>d</sup>
ALH	4,37±1,68 <sup>b</sup>	2,84±1,01 <sup>c</sup>	2,05±0,98 <sup>d</sup>	5,07±1,46 <sup>a</sup>
BCF	7,68±3,00 <sup>a</sup>	6,25±3,40 <sup>b</sup>	3,59±2,61 <sup>d</sup>	6,08±2,87 <sup>c</sup>
Total de muestras (n + % spzs)	18344 (9,95)	34100 (18,49)	96900 (52,54)	35085 (19,02)
Frescas (n + % spzs)**	13204 (20,36)	15022 (23,16)	21060 (32,47)	15581 (24,02)
Refrigeradas (n + % spzs)**	3657 (6,09)	9453 (15,74)	32655 (54,38)	14282 (23,78)
Descongeladas (n + % spzs)**	1483 (2,49)	9625 (16,17)	43185 (72,56)	5222 (8,77)
Fresco vs. Descongelado (%)	-17,87	-2,32	+40,09	-15,25

Los resultados son expresados en media aritmética  $\pm$  desviación estándar para las muestras de semen analizadas de los 5 ovinos. VCL= velocidad curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL= velocidad rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP= velocidad promedio ( $\mu\text{m/s}$ ), LIN= índice de linealidad (%), STR= índice de rectitud (%), WOB= índice de oscilación (%), ALH= desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ). spzs= Espermatozoides. El número total de espermatozoides analizados fue 184429. Súperíndices (a,b,c,d) diferentes en las filas denotan valores de la prueba Chi-cuadrado y Chi-cuadrado Mantel-Haenszel que revelan diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides de cada uno de los grupos para las muestras frescas, refrigeradas y descongeladas ( $P<0,0001$ ).

La SP1 resultó ser el grupúsculo espermático con mayor velocidad (VCL, VSL y VAP), así como (LIN, WOB, y BCF) lo que podría catalogarla como subpoblación de rápidos y progresivos, representada en 9,95% (18.344 espermatozoides) para el total de muestras. De este casi 10% un 20,36% fue de espermatozoides recién colectados, un 6,09% apenas para el semen refrigerado y una disminución tan marcada hasta niveles inferiores de 2,5%, evidenciando una disminución de más del 17% producto del crioprocésado.

La SP2, de acuerdo con la presentación de una velocidad rectilínea de 46,06  $\mu\text{m/s}$ , un índice de linealidad de 65,23% y un índice de oscilación de 82,98% podría categorizarse como la segunda subpoblación en cuanto a hidrodinámica de progreso en medio líquido, representada en 34.100 espermatozoides (18,49%) de las muestras totales y fue la menos afectada debido al crioprocésado (recién colectado *vs.* refrigerado *vs.* descongelado), con una disminución de 2,32% entre el fresco y el crioconservado.

La SP3 y SP4 conservaron sitiales intermedios bajos para casi todos los parámetros de motilidad y progresividad espermática, siendo la SP4 la primera en cuanto a desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y segundo en cuanto a VCL y VAP, lo que lleva a discernir que esta subpoblación contenía espermatozoides con motilidad media, pero con progresividad baja por sus desplazamientos abruptos al progresar en el medio acuoso, evidenciado también en un menor índice de LIN, STR y WOB de todas las muestras estudiadas ( $P < 0,001$ ). Esta SP4 tuvo una disminución del 15,25% por acción de los tratamientos de refrigerado (0,24%) y congelado (15,01% menos), respectivamente. Cifras que explican que el mayor cambio ocurrido en el crioprocésado fue evidenciado durante el paso de refrigeración a congelación/descongelación.

La SP3 fue la de mayor cambio drástico al criopreservar las muestras, con un aumento en su proporción final de más del 40%, siendo la SP con la menor progresividad (VCL, VSL y VAP) de las cuatro (4) Subpoblaciones, así como desplazamiento lateral de la cabeza espermática y frecuencia con que baten la cabeza los espermatozoides (ALH y BCF;  $P < 0,001$ ). Lo que podría incluir los espermatozoides lentos y explicaría el rápido ascenso en la proporción al crioprocésar las muestras frente a diferentes estresores criobiológicos.

Es importante recalcar que la SP4 posee la mayor cantidad de espermios rápidos de las cuatro (4) Subpoblaciones (92,60%) y solo un 5% de espermatozoides de velocidad media y lenta, sin embargo, su progresividad no es la adecuada por la falla de propulsión en su hidrodinámica de desplazamiento denotado en los porcentajes más bajos de linealidad y rectitud (Cociente de LIN, STR y WOB;  $P < 0,001$ ) (Figura 1).

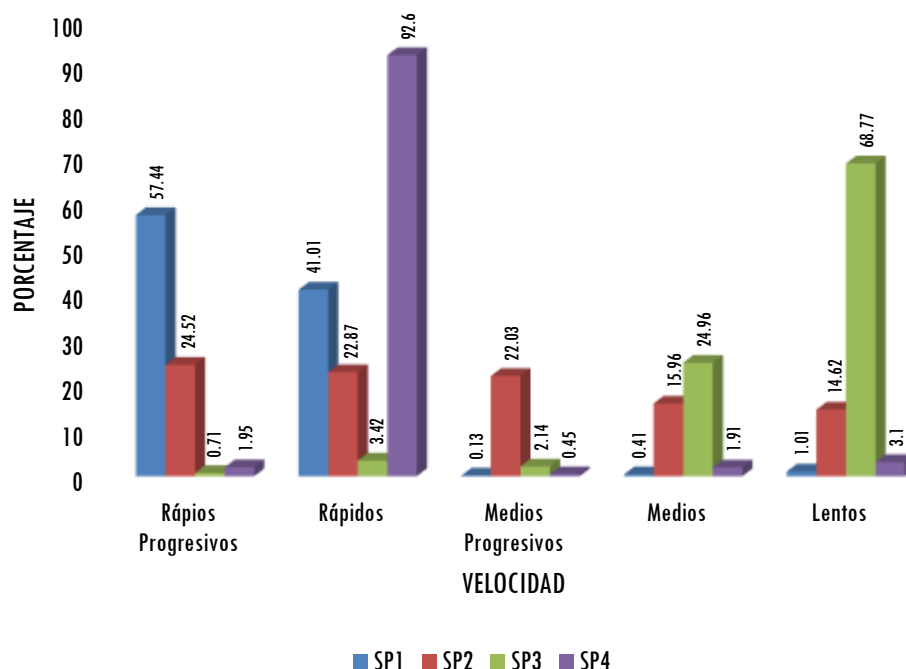


Figura 1. Relación entre la velocidad espermática y las Subpoblaciones

Del 100% de espermatozoides rápidos y progresivos de todas las muestras seminales evaluadas solo un 6,77% estuvieron contentivos en la SP3 y SP4, el resto 93,23% estaban en las subpoblaciones 1 y 2, empero, para la categoría rápidos sin progresividad marcada, la tendencia es cambiante, encontrándose que un 70,03% del total en las SP3 y SP4, hallazgo importante para denotar la línea tenue que diferencia la motilidad rápida con la progresividad en el plano de avance.

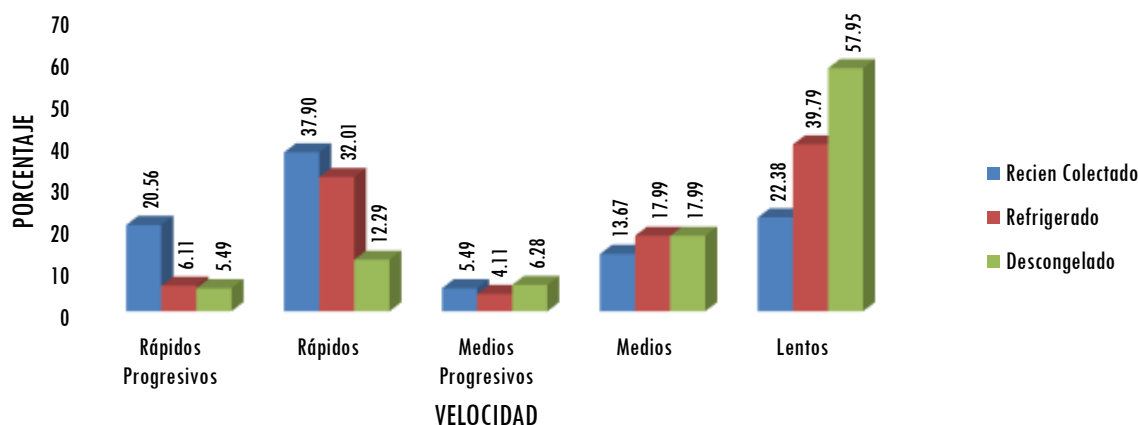
En la Tabla 4, se muestra el cambio proporcional de los cinco (5) tipos de movimiento y progresividad, de acuerdo con el crioprocésado. Quedando así que, haciendo énfasis para el primer caso la crioinjuria más marcada fue evidenciada en el paso de 38°C a 5°C (daño por frío en el descenso de temperatura para la estabilización), mientras para el caso de los rápidos únicamente, la disminución fue mayor en el paso de 5°C a la congelación a -196°C y posterior descongelación con los métodos convencionales (daño por el paso del punto de congelación). Para el caso de los espermios de velocidad media y lenta, era de esperarse que sus porcentajes por el crioconservado aumentarían a expensas de las pérdidas de progresividad.

La Figura 2 muestra como más de un 57% de espermatozoides eyaculados en los primeros 15 minutos de procesado presenta una velocidad rápida y progresiva. En contraparte el mayor porcentaje de espermatozoides lentos en toda la población de espermatozoides está ubicada en el semen refrigerado (39,79%) y crioconservado (57,95%). Sin embargo, para el semen crioconservado existe un total de 17,78% de espermatozoides rápidos y rápidos/progresivos, equivalentes a 8.890.000 de espermios motiles, si se sabe que cada pajuela fue estandarizada a 50.000.000 por dosis.

**Tabla 4. Relación entre el patrón de movimiento progresivo y el tratamiento de las muestras espermáticas ovinas**

Tratamiento	Rápido Prog.	Rápido	Medio Prog.	Medio	Lento
Recién colectado	65,80	48,09	36,47	29,19	19,91
Refrigerado	18,09	37,60	25,25	35,56	32,79
Descongelado	16,11	14,31	38,29	35,25	47,31
<b>Cambio por frío</b>	-47,71	-10,49	-11,22	+6,37	+12,88
<b>Cambio Congelado</b>	-1,98	-23,29	+13,04	-0,31	+14,52
<b>Total de Cambio</b>	-49,69	-33,78	+1,82	+6,06	+27,40

Los resultados son expresados en media aritmética para las muestras de semen analizadas de los 5 ovinos. Prog= Progresivo. Valores expresados en porcentajes (%).



**Figura 2. Relación el tratamiento de crioprocésado y la progresividad espermática**



## DISCUSIÓN

Como era de esperarse los parámetros obtenidos mediante CASA en cuanto a motilidad detectaron una marcada pérdida de progresividad de movimiento de 21,60% a 11,36% y posteriormente a 8,07% para las muestras recién colectadas, refrigeradas y descongeladas con diferencias significativas solo entre los extremos del tratamiento ( $P < 0,001$ ). La resistencia que muestre el desplazamiento espermático luego de la crioinjuria es de vital importancia para estimar la tolerancia a la criopreservación (Elia et al., 2010). Se sabe que eyaculados recién colectados que contengan espermios más rápidos y progresivos sobreviven mejor al efecto deletéreo de la congelación-descongelación seminal (Muiño et al., 2007).

En este sentido, resulta de gran importancia la utilización de los sistemas CASA que permiten el estudio de las características cinéticas de los espermatozoides con un grado de sofisticación sin precedentes (Abaigar et al., 1999). El desarrollo de una nueva manera de evaluar la motilidad individual progresiva resulta y adiciona mayor precisión al estimar este parámetro (Utt, 2015). Estos sistemas han permitido acumular evidencia suficiente para soportar el hecho de que la capacidad motil de los espermatozoides en un eyaculado es muy heterogénea, debiendo tener estas variaciones en la motilidad, su origen en el ensamblaje individual de los espermatozoides durante la espermiogénesis, así como en las diferencias en la maduración y tránsito dentro del epidídimo (Harrison, 1996).

El sistema CASA, al permitir determinar la trayectoria individual de los espermatozoides, puede determinar el estado fisiológico de cada espermatozoide de acuerdo con sus características de velocidad y progresividad (González-Villalobos, 2017). Este estado puede obtenerse de una data de cientos o miles de espermatozoides que puede ser sensible a la realización de análisis multivariados, en los que se establecen sub-grupos o “clusters” de espermatozoides con valores dentro de un mismo rango de las características observadas, lo que se ha denominado convencionalmente como subpoblaciones espermáticas (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2003, 2004; Esteo, 2006; Buzón, 2013). De tal manera, es posible clasificar los sementales o los eyaculados según la proporción de sub-grupos de espermatozoides establecidas estadísticamente según el comportamiento de las variables (Buzón, 2013).

En este experimento, el detrimento de la motilidad se evidencia fehacientemente cuando en las velocidades rectilíneas, curvilíneas y promedio (VCL, VSL, VAP) hubo una disminución de al menos 12% por cada tratamiento recién colectado vs. refrigerado vs. descongelado, y en algunos casos el decremento fue hasta de un 20% (recién colectado vs. refrigerado), lo que demuestra el “estrés por frío” en las muestras cuando son pasadas de 38°C a la temperatura de estabilización (5 °C por un mínimo de 2 horas). Algunos especialistas en congelación de semen ovino sugieren adoptar una estabilización a 5 °C por mayor tiempo (4 horas) que permita una mejor adaptación de las membranas espermáticas al cambio de estado durante la criopreservación (García, 2014), en contraparte otros estudios demuestran que para esta especie una estabilización entre una (1) a dos (2) horas es suficiente para lograr este fin (Vera-Muñoz, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Inclusive, trabajando con mini pajuelas de 0,25mL (Anel et al., 2003).

Con miras a afectar lo menos posible esta progresividad de movimiento espermático en animales de interés zootécnico, han sido postuladas muchas tasas de descenso de temperatura para diferentes rumiantes usados comúnmente en IA, teniendo así que para pasar por el punto de congelación (de 5 °C a -5 °C) rápidamente, se recomienda para el toro un disminución de -50 °C/min a -100 °C/min (Woelders et al., 1997) y para el morueco de -15 °C/min a -60 °C/min (Byrne et al., 2000; Anel et al., 2003). En este estudio la curva de descenso de temperatura de 5 °C a la temperatura de nitrógeno líquido (-196 °C) fue de aproximadamente -21 °C/min.

Para los dos (2) parámetros de motilidad menos deseables (lentos y estáticos) que presentaron un aumento considerable, evidenciándose notoria afectación de la velocidad y progresividad espermática al evaluarse las muestras frescas, refrigeradas y descongelada (Lentos: 19,33% vs. 31,81% vs. 37,25%) y (Estáticos: 15,55% vs. 17,60% vs. 37,48%). Los estresores criobiológicos y daño subletal evidencian este incremento, tal como ha sido observado en algunos estudios (Valdez, 2013; García, 2014; Vargas, 2015), producto de una sensibilidad a la crioinjuria que disminuye la viabilidad espermática medida en capacidad de movimiento y progresividad (Buzón, 2013). Este proceso ejerce sobre las membranas celulares una marcada acción deletérea, ocasionando daños como hinchamiento y disrupción, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una marcada pérdida de motilidad, una capacitación espermática anticipada y/o reacción acrosómica (Tartaglione y Ritta, 2004).

Los tres índices de desplazamiento frontal (linealidad, rectitud y oscilación) también presentaron una reducción en sus porcentajes motivados al efecto tratamiento ( $P < 0,001$ ) para todos los casos. Esto evidencia un cambio notorio en el patrón de movimiento espermático que altera la progresividad lineal de todos los espermatozoides. Más aún, si existe un incremento de la BCF y ALH durante el criopreservado. EL



parámetro ALH es un importante indicativo de frecuencia de rotación celular como probable propulsor de movimiento sobre todo si se disponen las muestras seminales en desplazamiento a través de moco cervical (Kumar et al., 2015).

En otro aspecto importante de motilidad espermática, la combinación CASA y agrupamiento FASTCLUS permitió identificar cuatro subpoblaciones (SP) espermáticas para estos moruecos reproductores, similar a lo conseguido por otros investigadores en esta especie (Yániz et al., 2015). Un total de 18.344 espermatozoides fueron categorizados como rápidos y progresivos (10%) del total de las muestras seminales procesadas. Importante número este si se sabe que en el tracto reproductivo de hembra ovina debería haber al menos entre 8-10 millones de espermatozoides con motilidad progresiva para asegurar la preñez (Córdova-Izquierdo et al., 2008). Lo que coincide con Muñio et al., 2007, quienes aseguran que para una mejor tolerancia a la criopreservación debe existir un alto porcentaje de espermatozoides rápidos y progresivos. Esta SP1 luego del crioprosesado, si se sumase con la segunda en VSL (SP2) contabilizaran un total 28,50% de espermios rápidos y progresivos luego de la crioinjuria, lo que lleva a inferir que, en una minipajuela de 50 millones de espermatozoides, representaría 14.250.000 de espermios, estando dentro de los parámetros óptimos (Vera-Muñoz, 2008).

Es importante mencionar que la SP4 posee la mayor cantidad de espermios rápidos no progresivos, de las cuatro (4) SP (92,60% de su total subpoblacional) y solo un 5% de espermatozoides de velocidad media y lenta, sin embargo, su progresividad no es la adecuada (bajos cocientes de LIN, STR y WOB). Pudiese ser que esta SP este experimentando una motilidad hiperactivada “*Wisplash*” (por el alto porcentaje de ALH) sin mayor progresividad que se encuentra próxima a una reacción acrosomal espontánea. Altos índices de ALH y BCF denotan una activación de movimiento de propulsión a manera de fenestrar las membranas ovocitarias, por lo cual esta cualidad de movimiento debería ocurrir lo más cerca al sitio de la fecundación (Buzón, 2013).

El proceso de criopreservación afecto a casi un 50% de los espermios rápidos progresivos de las muestras seminales, bajo las condiciones de este estudio. Similar caso, para los categorizados como únicamente rápidos por el CASA, donde hay una reducción de 33,78%. La VCL y VSL son los parámetros con mayor afectación por el crioprosesado cuando los espermatozoides de ovinos no son lavados y apartados del plasma seminal (García, 2014). En el caso del morueco, contienen ingentes cantidades de una proteína de plasma seminal de 66kD dependiente de andrógenos e involucrada en la adquisición de la capacidad de unión con la ZP<sub>3</sub> (Dacheux y Dacheux, 2001).

## CONCLUSIONES

Los eyaculados de ovinos tropicales contienen cuatro (4) subpoblaciones espermáticas en función de las variables cinéticas determinadas por el CASA. Además, se caracterizó el eyaculado de cada morueco en estudio en función de la proporción relativa de las subpoblaciones espermáticas según las variables cinéticas determinadas por el CASA en el semen recién colectado, refrigerado y descongelado, observándose que la criopreservación modificó la composición de estas subpoblaciones, generando una disminución de los espermatozoides rápidos y un incremento de los espermatozoides lentos y estáticos.

## REFERENCES

- Abaigar, T., Holt W.V., Harrison, R.A.P., Del Barrio G., 1999. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction** 60:32- 41.
- Anel, L., Paz, P.D., Álvarez, M., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., Manso, A., González, M., Kaabi, M., Anel, E. 2003. Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen. **Theriogenology** 60: 1293–1308.
- Byrne, G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Boland, M.P. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. **Animal Reproduction Science** 62: 265–275.
- Buzón, A. 2013. Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. **Tesis Doctoral**. Universidad de Córdoba, España. 123 p.
- Córdova-Izquierdo, A., Córdova-Jiménez, M., Córdova-Jiménez, C., Guerra-Liera, J. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. **Revista Veterinaria** 19 (1): 67–79.
- Dacheux, F., Dacheux, J. 2001. L'épididyme et les glandes annexes. En: **La reproduction chez les mammifères et l'Homme**. Coordonnateurs: Charles Thibault et Marieclaire Levasseur. Ellipses Édition Marketing, S.A. INRA. Paris, France. Chapitre 14: 455-468.

- Esteso, M. 2006. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ciervo. Relaciones con congelabilidad y calidad del semen. **Tesis Doctoral**, Universidad de Castilla la Mancha, España. 103 pp.
- García, W. 2014. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática acrosomal en semen criopreservado de carneros. **Tesis Doctoral**. Universidad Autónoma de Barcelona. 315 pp.
- González-Villalobos, D. 2017. Cinética del espermatozoide de cerdo y su utilidad como método de evaluación de la calidad seminal. **Trabajo de Ascenso categoría de Profesor Titular**. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela. 63 pp.
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara A., Yadava, Singh, P. Yadav P. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science** 22 (4): 123-134.
- Maroto-Morales A, Ramon M, García-Álvarez O, Montoro V, Soler AJ. 2010. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. **Theriogenology** 84: 1536-41.
- Maroto-Morales A.; Ramón M.; García-Álvarez O.; Soler A. J.; Esteso M. C.; Martínez Pastor F.; Pérez-Guzmán M. D.; Garde J. J. 2009. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. **Theriogenology** 3(4):437-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.003
- Muñio, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J., Fernández, A., Peña, A. 2007. Influencia de la raza y la edad en parámetros cinéticos de eyaculados bovinos. **ITEA. Producción animal**, 1(26), pp.: 341-343.
- Quintero-Moreno, A., J. Miró, A. Teresa Rigau, J. E. Rodríguez-Gil. 2003. Identification of Sperm Subpopulations with Specific Motility Characteristics in Stallion Ejaculates. **Theriogenology** 59(9): 1973–90.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil. J. 2004. Regression Analyses and Motile Sperm Subpopulation Structure Study as Improving Tools in Boar Semen Quality Analysis. **Theriogenology** 61(4): 673–90.
- Quintero-Moreno, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. (**Tesis Doctoral**). 164 pp.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals** 38: 312–318.
- Rodríguez-Martínez, H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. **Internacional Veterinary Information Service** (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.
- Rubio-Guillén, J., Montero, M., Portillo-Guevara, O., González-Villalobos, D., Aranguren-Méndez, J., Madrid-Bury, N., Villasmil-Ontiveros, Y., Quintero-Moreno, A. 2012. Comparación entre dos grupos raciales de ovinos tropicales mediante pruebas de viabilidad espermática. **XIII Jornadas Científico Técnicas de la Facultad de Agronomía LUZ**. 21-23/11/12. Maracaibo, Venezuela. 55p.
- Tartaglione, CM., MN. Ritta. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** 62(7): 1245-1252.
- Utt, M. 2015 Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science** 169:37-44 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.011>
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: **Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito**, C González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones ASTRODA S.A. Sección 5 (40): 495-504
- Buzón, A. 2013. Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. **Tesis Doctoral**. Universidad de Córdoba, España. 123 p
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: **Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito**, C González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones ASTRODA S.A. Sección 5 (40): 495-504
- Valdez, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen congelado ovino. **Tesis de Maestría**. Universidad de Cuenca. Ecuador. 74 pp.
- Vargas, P. 2015. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen criopreservado de carneros. **Tesis de Grado a Médico Veterinario**. Universidad Nacional del Altiplano. 81 pp.
- Woelders H, 1991: Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In: Johnson LA, Rath D (eds), **Boar Semen Preservation II**. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, pp. 145-164.
- Yániz, J. L. Soler, C., Recreo, P., Carretero, T., Bono, A. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science** 156 (MARCH): 128–134.