

DINÁMICAS ESPERMÁTICAS SUBPOBLACIONALES DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN EN EYACULADOS DE CAPRINO (*Capra aegagrus hircus*)

Sperm subpopulational dynamics during the cryopreservation procedure in caprine (*Capra aegagrus hircus*) ejaculates

J.P. Barbas, A.E. Horta, M. Garcia-Herreros

¹ Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária (INIAV),
Santarém, Portugal

* Autor correspondiente:
Manuel García-Herreros
Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I. P. (INIAV,
I.P.), Polo de Santarém,
Quinta da Fonte Boa,
2005-048, Santarém,
Portugal. Tel.: (+351)
243767 ext. 330.

E-mail address:
herrerosgm@gmail.com

Recibido: 07/07/2017
Evaluado: 05/08/2017
Aceptado: 25/08/2017

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la dinámica espermática subpoblacional mediante la evaluación objetiva de parámetros cinéticos funcionales durante la criopreservación del semen de caprino. Se utilizaron 40 eyaculados procedentes de 8 machos en los que se evaluaron los parámetros de volumen, concentración, viabilidad, integridad acrosómica y motilidad espermática objetiva mediante sistema computarizado de análisis seminal (CASA). Se evaluaron un total de 8 parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF y WOB) en cada etapa de manipulación de la muestra espermática durante el periodo de criopreservación [1º: semen fresco (F); 2º: 1er lavado/centrifugación (1LC); 3º: 2º lavado/centrifugación (2LC); 4º: enfriamiento o "cooling" a 4°C (CL) y 5º: pos-descongelación a 37°C (PD)]. Los resultados derivados de los parámetros cinéticos espermáticos se analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA) y análisis multivariante de conglomerados para identificar la relación entre las subpoblaciones espermáticas obtenidas y los parámetros funcionales de motilidad en cada etapa. Se detectaron cuatro subpoblaciones espermáticas en la 2ª, 3ª y 5ª etapa (Sbp1LC1-Sbp1LC4, Sbp2LC1-Sbp2LC4 y SbpPD1-SbpPD4) y tres en la 1ª (SbpF1-SbpF3) y 4ª etapa (SbpCL1-SbpCL3). Según los parámetros de velocidad obtenidos en cada subpoblación diferenciada se observaron células rápidas, lentas, activas, pasivas, progresivas y no progresivas. Por otro lado, tomando en cuenta los parámetros de linealidad se observaron trayectorias espermáticas curvilíneas, rectilíneas, parabólicas y erráticas. Se observó variabilidad en las subpoblaciones detectadas a lo largo de las etapas de manipulación evaluadas habiendo múltiples diferencias significativas entre los parámetros cinéticos obtenidos intra e inter-subpoblacionales ($p < 0,001$) así como en la frecuencia de distribución de las subpoblaciones obtenidas entre etapas ($p < 0,05$). En conclusión, el presente estudio confirmó la existencia de variabilidad y heterogeneidad en los parámetros cinéticos espermáticos en el eyaculado caprino a lo largo del proceso de criopreservación. La relación entre la estructura subpoblacional espermática y las diferentes etapas de manipulación fue estadísticamente significativa, especialmente en las etapas de enfriamiento o "cooling" y pos-descongelación debido a que éstas alteraron de forma drástica los parámetros cinéticos espermáticos.

Palabras clave: Subpoblaciones espermáticas, criopreservación, semen, caprino.

ABSTRACT

The objective of the present research was to determine specific sperm subpopulational dynamics in different processing steps during cryopreservation process by using objective functional sperm kinematic descriptors in goat ejaculates. Fresh ejaculates ($n=40$) collected from eight bucks were analysed for volume, concentration, sperm viability, acrosome integrity, and sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA) system. Eight sperm kinematic descriptors (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF, ALH, and WOB) were assessed using CASA system after five different handling step (1st: fresh semen collection (F); 2nd: 1st washing/centrifugation step (1WC); 3rd: 2nd washing/centrifugation step (2WC); 4th: cooling step at 4°C (CL); and 5th: post-thawing step at 37°C (PT)) during a standard cryopreservation protocol for goat semen. The results obtained from the kinematic parameters were analysed by using Principal Component Analysis (PCA) and multivariate clustering procedures to identify specific kinematic subpopulations and establish the relationship between the distribution of the subpopulations found and the functional sperm motility

in each step. Except for the 1st (SbpF1-SbpF3) and 4th (SbpCL1-SbpCL3) intervals, four sperm kinematic subpopulations (Sbp1LC1-Sbp1LC4, Sbp2LC1-Sbp2LC4 and SbpPD1-SbpPD4) were observed. Based on kinematic velocity parameters and the subpopulation disclosed, rapid, slow, vigorous, passive, non-progressive and progressive sperm were discerned. Moreover, based on kinematic linearity parameters and depending on the subpopulation uncovered, curvilinear, regular-linear, parabolic and erratic-non-linear trajectories were detected. Subpopulations remained variable throughout handling steps and multiple significant differences among the sperm kinematic parameters were observed ($p < 0.001$) as well as in the frequency of distribution of kinematic subpopulations among steps ($p < 0.05$). In conclusion, this study confirms the variability and heterogeneity of goat sperm kinematic patterns throughout the cryopreservation process. The relationships among sperm subpopulation structure and the different handling steps were particularly relevant, specially after the cooling and the post-thawing steps, when effects derived from these critical handling steps were evident and altered drastically the sperm motion patterns.

Keywords: Sperm subpopulations, cryopreservation, semen, caprine

INTRODUCCION

La criopreservación de gametos es crucial para la creación de bancos de recursos genéticos. Durante años se han desarrollado diferentes técnicas para la obtención de muestras, así como metodologías para su almacenamiento en condiciones no fisiológicas para asegurar la disponibilidad futura y diversidad del material genético procedente de diferentes especies domésticas (Blackburn, 2012). En caprino se han probado diferentes protocolos de criopreservación de semen, sin embargo, tras el proceso de dilución y estrés osmótico, así como los procesos de enfriamiento y congelación-descongelación, la fertilidad del semen se ve fuertemente afectada (Konyali *et al.*, 2013). La disminución de la fertilidad durante el proceso de criopreservación es especialmente relevante en caprino debido a los efectos negativos que tiene la reacción enzimática entre la fosfolipasa del plasma seminal (producida en las glándulas bulbouretrales) y la lecitina que contiene la yema de huevo del diluyente de congelación, que resulta perjudicial debido a la formación de lisolectina que es tóxica para los espermatozoides (Leboeuf *et al.*, 2000). El resultado de este hecho es la disminución de la capacidad móvil de los espermatozoides y la consecuente pérdida de fertilidad de éstos cuando se utiliza yema de huevo en el diluyente. Para intentar solucionar este problema, algunos investigadores han intentado disminuir o incluso reemplazar el diluyente de congelación basado en yema de huevo, junto con protocolos de eliminación del plasma seminal, limitando así los efectos negativos de la interacción de la fosfolipasa con la lecitina (Chelucci *et al.*, 2015). Este hecho es importante en caprino, puesto que la motilidad espermática tras la descongelación del semen es incluso menor que en otras especies domésticas (Leboeuf *et al.*, 2000).

En la actualidad, la disponibilidad de sistemas automáticos de análisis seminal (CASA) puede ayudar a la determinación de etapas críticas durante el proceso de criopreservación del semen teniendo en cuenta las variaciones producidas en la motilidad espermática. Desde hace tiempo, la comunidad científica ha llevado a cabo estudios basados en la diferenciación de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado las cuales muestran características cinéticas diferentes (Satake *et al.*, 2006; García-Herreros *et al.*, 2012). De hecho, la ESHRE (ESHRE; European Society of Human Reproduction and Embryology, 1998) admite que el uso de análisis estadísticos convencionales basados en valores de medias no son apropiados y tienen un valor limitado debido a que consideran al eyaculado como una población espermática homogénea y ajustada a una distribución normal. Por lo tanto, los estudios basados en análisis espermáticos subpoblacionales son esenciales para la identificación de poblaciones espermáticas específicas con características móviles ideales, especialmente durante técnicas de manipulación agresivas tales como el proceso de criopreservación de semen (Furstos

et al., 2010). Así, evaluando la variación de la estructura subpoblacional durante las diferentes etapas de la manipulación espermática ayudaría notablemente a incrementar el conocimiento de los efectos de la criopreservación en la motilidad espermática, y por tanto, en la resistencia del semen a los procesos de congelación-descongelación.

Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron: (a) identificar la posible existencia de subpoblaciones espermáticas basadas en parámetros de motilidad específicos en eyaculados de caprino y (b) evaluar los efectos de la criopreservación en las características subpoblacionales teniendo en cuenta las cinéticas espermáticas obtenidas en las diferentes etapas de manipulación del protocolo de congelación-descongelación del semen caprino.

MATERIAL Y METODOS

Animales, obtención de los eyaculados y análisis de la calidad espermática

En el presente estudio se utilizaron 8 machos de caprino (*Capra aegagrus hircus*) de raza Serrana (12-48 meses de edad) ubicados en el Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Portugal (latitud: 39° 11' 28" N, longitud: 8° 43' 49" O). Todos los animales eran fértiles (usados en programas de inseminación artificial), se mantenían bajo condiciones nutricionales iguales (condición corporal equilibrada de 3-3,5 dentro de una escala de 1-5) y cumplían con los respectivos controles sanitarios. Los eyaculados ($n = 40$; 5 por individuo) se obtuvieron semanalmente entre los meses de enero a junio mediante vagina artificial atemperada en tubos de vidrio de 15 mL. Para ello se utilizó una hembra ovariectomizada y estrogenizada. Tras la obtención de cada eyaculado se realizó un análisis inmediato de las características de éste (volumen y concentración espermática), teniendo en cuenta que su motilidad espermática fuese $\geq 75\%$, el porcentaje de anomalías morfológicas fuese $\leq 10\%$ y la concentración espermática fuese $\geq 3 \times 10^9$ espermatozoides/mL. Además, se realizaron análisis de integridad del acrosoma (glutaraldehído 2%) e integridad de la membrana plasmática (eosina-nigrosina) antes y después del proceso de criopreservación.

Protocolo de congelación del semen y análisis de muestras en cada etapa

La congelación del semen se realizó mediante el protocolo de Evans y Maxwell (1987) con ligeras modificaciones para su adaptación al caprino. Los eyaculados frescos (1ª etapa: fresco) se diluyeron hasta una concentración de 400 x 10⁶ espermatozoides/mL en el buffer Krebs-Ringer-Fosfato-Glucosa (KRPFG; 0,9% NaCl, 1,15% KCl, 1,22% CaCl₂, 2,11%

KH₂PO₄, 3,82% MgSO₄·7H₂O y 5,24% glucosa) en tubos de vidrio de 15 mL mantenidos a 30°C en baño de agua. A continuación, se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 min. a 500 x g (2ª etapa: 1er lavado/centrifugación). A continuación, se retiró el sobrenadante y se volvió a realizar un segundo lavado en las mismas condiciones que el anterior (3ª etapa: 2º lavado/centrifugación). El precipitado resultante se diluyó en el buffer de criopreservación (300 mM Tris, 27.8 mM glucosa, 94.7 mM ácido cítrico suplementado con un 4% de yema de huevo (pH 7; osmolaridad: 295 mOsm/kg), 3% glicerol (v/v), 1 mg/mL de sulfato de dihidroestreptomicina y 0,06 mg/mL de bencilpenicilina) a una concentración final de 800 x 10⁶ espermatozoides/mL. Finalmente, el semen se cargó en pajuelas de 0,25 mL y se realizó el equilibrado en cámara fría durante al menos 3h hasta alcanzar una temperatura estable de 4°C (4ª etapa: enfriamiento o "cooling"). A continuación, las dosis se colocaron sobre nitrógeno líquido durante 20 min (Evans y Maxwell, 1987) antes de sumergirlas completamente para después transferirlas a tanques de almacenamiento. Se estableció un período de espera de una semana antes de proceder al protocolo de descongelación de muestras a 37°C durante 30 s. (5ª etapa: pos-descongelación) para su posterior análisis.

Análisis objetivo de la motilidad espermática mediante Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA)

Se llevó a cabo un análisis de la motilidad espermática objetiva en cada una de las etapas de manipulación de las muestras espermáticas durante el proceso de criopreservación descrito anteriormente. Para ello se utilizó una cámara digital MotiCam 2000 (CMOS 1/2"; Motic Corporation, Ltd., Hong Kong, China) adaptada a un microscopio (Olympus Model BX 41, Tokyo, Japan) dotado de platina atemperada (37°C) y conectada a un procesador Pentium P8400 4GB. El sistema incluye una interface de análisis por imagen Motic Images Plus 2.0ML (Motic China Group, Ltd., Hong Kong). La cámara de video envía las imágenes captadas al procesador, donde serán almacenadas para su posterior análisis (Wilson-Leedy *et al.*, 2007). Se analizaron en total 8 parámetros cinéticos de velocidad y linealidad: velocidad curvilínea (VCL: Distancia total recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo; $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL: Distancia total recorrida por el espermatozoide en línea recta entre el primer punto y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo; VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad promedio/media (VAP: Distancia total recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria intermedia por unidad de tiempo; $\mu\text{m/s}$), linealidad (LIN: relación porcentual entre VSL/VCL x 100; %), rectitud (STR: relación porcentual entre VSL/VAP x 100; %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH: valor medio de la magnitud del desplazamiento lateral máximo de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio con cada ciclo de batido; μm), frecuencia de batido (BCF: frecuencia con la que la trayectoria real (curvilínea) atraviesa la trayectoria media o promedio; Hz) y la oscilación (WOB: relación porcentual entre VAP/VCL x 100; %). Para cada muestra espermática se analizaron al menos cinco campos microscópicos diferentes incluyendo un mínimo de 2.000 células.

Análisis estadístico

El objetivo principal del análisis es identificar las diferentes subpoblaciones basadas en las características cinéticas celulares específicos en cada etapa del protocolo de criopreservación. El primer paso fue realizar un análisis de componentes principales (PCA) para obtener el porcentaje máximo de varianza que pueda explicar conjuntos globales de

datos con características similares. La finalidad es conseguir un pequeño número de combinaciones lineales (Componentes Principales, PCs) que retengan la máxima información posible proveniente de los ocho descriptores cinéticos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF, ALH y WOB). Para ello se utilizó el método de rotación VARIMAX y el método de normalización de Kaiser. A continuación, se llevó a cabo un análisis no jerárquico de los resultados, así como un modelo de k-medias (distancias Euclídeas) con los resultados cuantitativos obtenidos de las diferentes variables cinéticas. El análisis multivariado se realizó para la clasificación de los espermatozoides en grupos reducidos (subpoblaciones) para finalmente realizar una última clasificación jerárquica mediante el método aritmético UPGMA. Además, se analizó la influencia de cada etapa durante la criopreservación mediante un análisis general lineal (GLM). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la utilización del software SPSS v. 15 para Windows. Tras una previa exploración de los datos, se procedió a la aplicación del test ANOVA de una vía para la comparación de las medias obtenidas a partir de los diferentes parámetros cinéticos cuantitativos. Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas se llevaron a cabo análisis estadísticos basados en comparaciones múltiples mediante el test post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de motilidad, viabilidad e integridad de la membrana acrosómica ($p < 0,05$), siendo significativamente mayores en las muestras de semen fresco. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en relación con el parámetro de morfología espermática ($P > 0,05$; Figura 1).

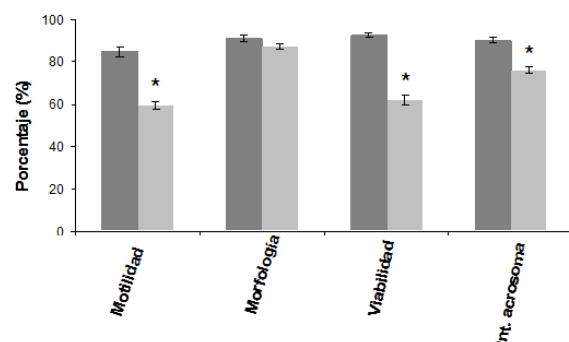


Figura 1. Parámetros de calidad espermática (motilidad, morfología, viabilidad e integridad acrosómica) en eyaculados frescos de caprino y tras el proceso de criopreservación (muestras descongeladas). Todos los individuos (8 machos) forman parte del programa de inseminación artificial del centro. En gris oscuro se muestran los resultados en semen fresco y en gris claro en semen descongelado. * ($P \leq 0,05$).

Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las velocidades (VCL, VSL y VAP) entre las diferentes etapas del procesamiento de congelación del semen, siendo significativamente más elevadas en las tres primeras etapas ($P < 0,05$; Figura 2).

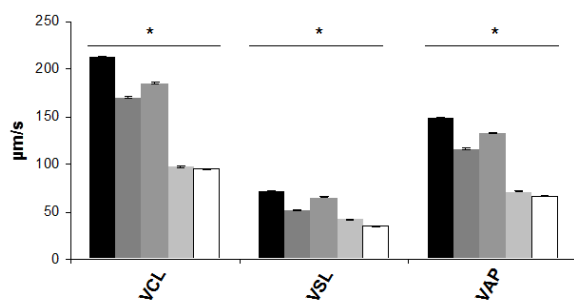


Figura 2. Parámetros cinéticos de velocidad (VCL, VSL y VAP) en los diferentes procesos de manipulación de muestras seminales (etapas 1, 2, 3, 4 y 5) durante el protocolo de criopreservación de semen de caprino llevado a cabo en el presente estudio. Negro (1ª etapa: semen fresco), gris oscuro (2ª etapa: 1ª centrifugación), gris (3ª etapa: 2ª centrifugación), gris claro (4ª etapa: enfriamiento o "cooling") y blanco (5ª etapa: post-descongelación). El símbolo de asterisco (*) en cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre las diferentes etapas de manipulación de las muestras seminales durante el protocolo de criopreservación. VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio.

También se registraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de linealidad seminal (LIN, STR y WOB), así como en los parámetros de ALH y BCF entre las diferentes etapas de manipulación de las muestras seminales durante el protocolo de criopreservación, siendo significativamente más elevados en las últimas etapas ($P < 0,05$; Fig. 3).

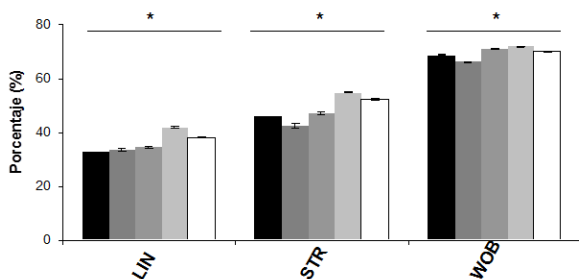


Figura 3. Parámetros cinéticos de linealidad (LIN, STR y WOB) en los diferentes procesos de manipulación de muestras seminales (etapas 1, 2, 3, 4 y 5) durante el protocolo de criopreservación de semen caprino. Negro (1ª etapa: semen fresco), gris oscuro (2ª etapa: 1ª centrifugación), gris (3ª etapa: 2ª centrifugación), gris claro (4ª etapa: enfriamiento o "cooling") y blanco (5ª etapa: post-descongelación). El símbolo de asterisco (*) en cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre las diferentes etapas de manipulación de las muestras seminales durante el protocolo de criopreservación. LIN: Linealidad; STR: Rectitud; WOB: Oscilación.

Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución (% de células clasificadas) en las diferentes etapas de manipulación de las muestras seminales dentro de cada subpoblación diferenciada ($p < 0,001$; Figura 4).

Análisis de Componentes Principales y de Conglomerados

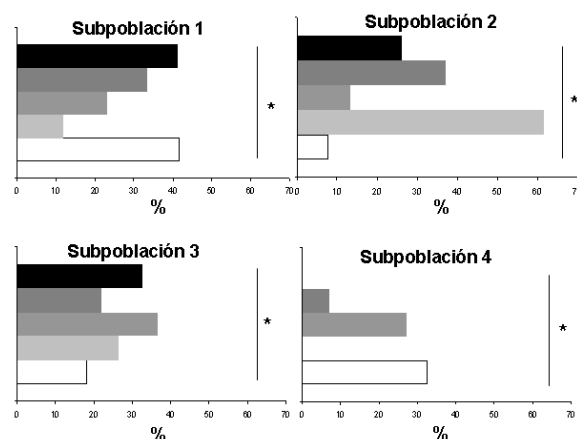


Figura 4. Subpoblaciones espermáticas y su distribución (% células) obtenidos tras el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis multivariante de conglomerados durante el protocolo de criopreservación de semen caprino. Negro (1ª etapa: semen fresco), gris oscuro (2ª etapa: 1ª centrifugación), gris (3ª etapa: 2ª centrifugación), gris claro (4ª etapa: enfriamiento o "cooling") y blanco (5ª etapa: post-descongelación). El símbolo de asterisco (*) en cada parámetro indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,001$) entre las diferentes etapas de manipulación de las muestras seminales durante el protocolo de criopreservación.

En las muestras de semen fresco cuyos valores cuantitativos se expresan con anterioridad (negro; Fig. 4) se identificaron 3 subpoblaciones espermáticas con características cinéticas específicas:

La primera subpoblación (SbpF1) se caracterizó por tener espermatozoides muy rápidos (altos valores de VCL y VAP) medianamente progresivos (valor VSL intermedio) con trayectorias erráticas (valores bajos en LIN, STR y WOB). La segunda subpoblación (SbpF2) contenía espermatozoides rápidos (valores altos de VCL y VAP) y muy progresivos (valor muy alto de VSL) con trayectorias lineales tal y como indican los valores de LIN, STR y WOB junto al valor de ALH. La tercera subpoblación 3 (SbpF3) incluyó espermatozoides lentos (los valores bajos de VCL y VAP) con progresividad muy baja (el valor bajo de VSL) mostrando trayectorias erráticas tal como indican los bajos valores de LIN, STR y WOB (Fig. 4).

En las muestras espermáticas obtenidas tras el 1er lavado/centrifugación cuyos valores cuantitativos se expresan anteriormente (gris oscuro; Fig.4) se identificaron 4 subpoblaciones con las siguientes características cinéticas:

La Sbp1LC1 incluyó espermatozoides rápidos, aunque con baja progresividad mostrando trayectorias curvilíneas tal y como indicaron los valores de VCL, VAP y ALH junto con los valores moderados de VSL y bajos de LIN, STR, y WOB. La Sbp1LC2 se caracterizó por contener espermatozoides muy lentos y erráticos con muy baja velocidad y progresividad (bajos valores de VCL, VSL y VAP) con trayectorias oscilatorias (bajos valores de LIN, STR y WOB). Por lo contrario, la Sbp1LC3 estaba compuesta por espermatozoides muy activos y muy progresivos con trayectorias lineales por los valores reflejados en VCL, VSL, VAP, así como los valores de LIN, STR, WOB y BCF mostrando ser una subpoblación de gran calidad espermática. Finalmente, la Sbp1LC4 incluyó células bastante pasivas (valores moderados de VCL, VSL y VAP) aunque con

trayectorias muy lineales (altos valores de LIN, STR y WOB) (Fig. 4).

En las muestras espermáticas obtenidas a partir del segundo lavado/centrifugación cuyos valores cuantitativos se expresan con anterioridad (gris; Fig. 4) se obtuvieron 4 subpoblaciones tras los análisis de PCA y de conglomerados:

La primera subpoblación (Sbp2LC1) se caracterizó por poseer espermatozoides con velocidad intermedia, aunque progresivos y de trayectoria rectilínea (según los valores de VCL, VAP y BCF junto con los altos valores de VSL, LIN, STR, WOB y ALH). En cuanto a la segunda subpoblación (Sbp2LC2) la formaron espermatozoides muy activos con alta progresividad y linealidad teniendo los valores más altos de VCL, VSL, VAP, BCF, LIN, STR y WOB. La tercera, Sbp2LC3 también contenía células rápidas, aunque poco progresivas mostrando movimientos curvilíneos y a veces erráticos (altos valores de VCL y VAP junto con bajos valores de VSL, LIN y STR). Finalmente, la Sbp2LC4 poseía los espermatozoides más pasivos en cuanto a velocidad y progresividad (VCL, VSL y VAP bajos) con gran oscilación en su trayectoria (LIN, STR, WOB y ALH muy bajos) (Fig. 4).

Derivado del resultado del análisis PCA y de conglomerados de la cuarta etapa cuyos valores cuantitativos se expresan anteriormente (gris claro; Fig. 4) (enfriamiento o "cooling"), se obtuvieron 3 subpoblaciones espermáticas durante el proceso de criopreservación con las siguientes características cinéticas:

La subpoblación 1 (SbpCL1) contenía células muy activas con trayectorias bastante rectilíneas y progresivas tal y como indicaron sus altos valores de VCL, VSL y VAP junto con valores moderadamente altos de VSL, LIN, STR y WOB. La subpoblación 2 (SbpCL2) estaba compuesta por células muy lentas (valor de VCL y VAP bajo), pobre progresividad (VSL bajo) y trayectorias erráticas debido a los bajos valores de LIN, STR y WOB. La tercera y última subpoblación (SbpCL3) estaba compuesta por espermatozoides moderadamente activos (valores intermedios de VCL y VAP) aunque bastante progresivos (alto valor de VSL) mostrando los valores más altos de LIN, STR y WOB y por tanto, las trayectorias más rectilíneas y regulares.

En el último análisis PCA y de conglomerados tras la descongelación de las muestras espermáticas criopreservadas, cuyos valores cuantitativos se expresan con anterioridad (blanco; Fig.4), se obtuvieron 4 subpoblaciones celulares con las siguientes características cinéticas:

La primera subpoblación (SbpPD1) estaba representada por células muy pasivas con la progresividad más baja y las trayectorias más irregulares según los valores de VCL, VAP, VSL, LIN, STR y WOB siendo la subpoblación de peor calidad. La segunda subpoblación (SbpPD2) se caracterizó por espermatozoides activos, progresivos y con unas trayectorias muy regulares (altos valores de VSL, VAP, LIN, STR y WOB). A tercera (SbpPD3) contenía células activas (valores elevados de VCL y VAP) pero baja progresión cinética (VSL) mostrando trayectorias sinuosas según mostraron sus valores de LIN, STR y WOB. La última subpoblación (SbpPD4) la formaron células pasivas, aunque con trayectorias muy lineales (bajos valores de VCL, VSL y VAP junto con altos valores de LIN, STR y WOB) (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En la actualidad, existe la necesidad de mejorar y desarrollar diferentes protocolos de criopreservación espermática en

caprino debido que no existen protocolos eficientes para la aplicación de éstos en la crioconservación de dosis destinadas a inseminación artificial (Cseh *et al.*, 2012). A pesar del desarrollo de nuevas técnicas de inseminación y del relativo mejoramiento de los protocolos de congelación de semen caprino, apenas se han llegado a obtener tasas de gestación entorno al 60% con semen criopreservado (Leboeuf *et al.*, 2000). En el presente estudio, se han analizado los efectos de las diferentes etapas de manipulación de muestras espermáticas sometidas a un protocolo de criopreservación estandarizado con el fin de ver la influencia que estas etapas tienen en las características cinéticas de las células. Este estudio es importante debido a que, de manera general, el parámetro de motilidad espermática se ha tomado como referencia para la determinación de la fertilidad y calidad de muestras seminales, tanto en eyaculados frescos como en semen criopreservado (Henning *et al.* 2014). En este caso, se ha llevado a cabo un análisis PCA seguido de un análisis de conglomerados para determinar la presencia de subpoblaciones espermáticas basados en diferentes parámetros de velocidad y linealidad espermática en diferentes etapas (fresco, 1ª centrifugación, 2ª centrifugación, enfriamiento o "cooling" y pos-descongelación). Además del shock por frío en el caso de muestras criopreservadas, se sabe que existen otros factores intrínsecos (factores fisiológicos celulares, etc.) así como extrínsecos (pH, conductividad, estrés osmótico, etc.) que también influyen directa o indirectamente en la calidad del semen (Martí *et al.* 2011; Verberckmoes *et al.*, 2004). En el presente estudio, se han observado que existen etapas críticas durante la manipulación de las muestras espermáticas, sin embargo, al menos en caprino, no parecen estar relacionadas con los procesos de lavado y centrifugación (pérdida de colesterol de la membrana, efecto dilución, etc...), como ocurre con otras especies (Verberckmoes *et al.*, 2004), sino que está afectado por el período de enfriamiento o "cooling" (4°C) y también con el proceso crítico de la congelación-descongelación (-196°C- 37°C). Desde el punto de vista práctico, los resultados del presente estudio pueden servir para que los centros de inseminación y bancos de germoplasma tengan en cuenta los puntos críticos que afectan de forma irreversible la fertilidad de las muestras espermáticas procesadas. Además, la identificación de subpoblaciones espermáticas puede reemplazar estudios realizados mediante análisis estadísticos tradicionales, donde se considera al eyaculado como una población homogénea de células, sin tener la cuenta las diferentes características cinéticas a nivel individual, lo cual convierte al análisis convencional en un análisis poco adecuado (Martí *et al.*, 2012). Así los resultados derivados del sistema CASA, del PCA y del análisis multivariante de conglomerados revelaron características funcionales diferenciales muy interesantes, demostrando que el eyaculado se compone de diferentes grupos celulares (subpoblaciones con características cinéticas diferenciadas) que se comportan de formas específicas dependiendo del proceso al que sea sometido la muestra espermática (Satake *et al.*, 2006). Es necesario remarcar, que no sólo el número de subpoblaciones espermáticas varió notablemente entre las etapas estudiadas, sino que, además, debido probablemente a los diferentes medios utilizados y al sometimiento de las muestras espermáticas a diferentes temperaturas durante el proceso de criopreservación, la distribución de esas muestras espermáticas cambió radicalmente entre las diferentes etapas. Una posible explicación podría estar basada en los diferentes niveles de calidad espermática entre las diferentes subpoblaciones (Sbp1 a Sbp 4) derivado del cambio sufrido por los parámetros cinéticos medidos mediante sistema CASA (Henning *et al.*, 2014). Además, las diferencias obtenidas en cuanto a los parámetros cinéticos en las diferentes etapas pueden deberse

a diferentes estados fisiológicos de las células tales como el grado de capacitación espermática, el cual se lleva a cabo de una forma heterogénea y progresiva en las diferentes poblaciones celulares (García Herreros *et al.*, 2005). Un ejemplo de ello es el cambio en la estructura subpoblacional que se produce tras las dos etapas de lavado, donde el aumento en el número de subpoblaciones comparado con el semen fresco puede ser debido al cambio producido en la estructura de membrana del espermatozoide (pérdida de colesterol y/o pérdida y translocación de fosfolípidos de membrana) (García Herreros *et al.*, 2005). Por lo tanto, el comportamiento cinético de las células puede estar determinado por parámetros biofísicos y parámetros bioquímicos, los cuales a su vez pueden determinar la existencia de marcadores de crioresistencia (García-Herreros *et al.*, 2014). Otra observación interesante es que los eyaculados que muestran subpoblaciones con características cinéticas de gran calidad, es decir, espermatozoides rápidos y progresivos, muestran una resistencia al proceso de criopreservación más acentuada (Knox, 2015). Por lo contrario, los eyaculados que tienen una peor capacidad para soportar el proceso de congelación-descongelación tendrían una subpoblación espermática donde la predominancia en la distribución de células sería notablemente mayor en subpoblaciones con parámetros cinéticos bajos (principalmente en cuanto a la velocidad). Por lo tanto, podríamos afirmar, que la predominancia de una subpoblación con características cinéticas determinadas puede condicionar directa o indirectamente la resistencia a la criopreservación en eyaculados de caprino.

CONCLUSION

En conclusión, en el presente estudio fue posible identificar diferentes subpoblaciones espermáticas (3, 4, 4, 3 y 4) durante las etapas del proceso de criopreservación (F, 1LC, 2LC, CL y PD, respectivamente) basados en los parámetros cinéticos espermáticos obtenidos a partir del sistema CASA. Las frecuencias de distribución de dichas subpoblaciones obtenidas a partir del análisis PCA y el análisis multivariado demuestran que existen simultáneamente grupos celulares con características cinéticas diferenciadas, lo cual puede ser de gran ayuda para identificar los puntos críticos que afectan la motilidad espermática durante el proceso de criopreservación y así poder realizar ajustes para mejorar los resultados de funcionalidad del semen caprino criopreservado.

CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer el esfuerzo de todas las personas y laboratorios que hicieron posible la ejecución de la presente investigación. Proyecto (MAEC, 2010-IA).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: JPB, AEH y MG-H
 Desarrollo de la metodología: MG-H
 Concepción y diseño: MG-H
 Edición del artículo: MG-H
 Supervisión del estudio: MG-H

REFERENCIAS

- Blackburn HD. Genetic selection and conservation of genetic diversity. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47:249-54.
- Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S, Berlinguer F. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology.* 2015; 83:1064-74.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci.* 2012; 130:187-92.
- European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod.* 1998; 13:1-350.
- Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats, Butterworths, Wellington, New Zealand. 1987.
- Furstoss V, Borderes F, Forgerit Y, Guillouet P, Leboeuf B. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology.* 2010; 74:1197-206.
- García Herreros M, Aparicio IM, Nunez I, García-Marin LJ, Gil MC, Pena Vega FJ. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology.* 2005; 63:795-805.
- García-Herreros M, Leal CL. Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia.* 2014; 46:820-2.
- Henning H, Petrunkina AM, Harrison RA, Waberski D. Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 26:623-32.
- Knox RV. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. *Reprod Domest Anim.* 2015; 50:90-7.
- Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology.* 2013; 67:124-31.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62:113-41.
- Martí JI, Aparicio IM, García-Herreros M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology.* 2011; 75: 47
- Martí JI, Aparicio IM, Leal CL, García-Herreros M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates. *Theriogenology.* 2012; 78:528-41.
- Satake N, Elliott RM, Watson PF, Holt WV. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol.* 2006; 209:1560-72.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, de Kruijff A. Storage of fresh bovine semen in a diluent based on the ionic composition of cauda epididymal plasma. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39:410-6.