



## EFECTO DEL PROTECTOR DE MEMBRANA ESPERMÁTICA EN LA CONGELABILIDAD DEL SEMEN CAPRINO †

### [EFFECT OF THE SPERM MEMBRANE PROTECTOR ON THE FREEZABILITY OF GOAT SEMEN]

J. Martínez-Duran<sup>1</sup>, O. Duverger-Tellez<sup>1</sup>, N. Díaz-Martínez<sup>1</sup>,  
L. Interian-Alvarez<sup>1</sup>, R. Denis-García<sup>1</sup> and A. Palacios-Espinosa<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Biotecnología. Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), Cotorro, Avenida 101 e/100 y 62 No. 6214 Loma de Tierra, La Habana, Cuba. Emails: [fefamar63@gmail.com](mailto:fefamar63@gmail.com), [o.duverger39@gmail.com](mailto:o.duverger39@gmail.com), [namibia011977@gmail.com](mailto:namibia011977@gmail.com), [interian1983@gmail.com](mailto:interian1983@gmail.com), [denisrg64@yahoo.es](mailto:denisrg64@yahoo.es),

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Km. 5.5 carretera al Sur, Colonia El Mezquitito. C.P. 23080. La Paz, B.C.S., México. Email: [palacios@uabcs.mx](mailto:palacios@uabcs.mx)

\*Corresponding author

### SUMMARY

**Background:** Prior to freezing goat semen, it is necessary to perform seminal washing by centrifugation to eliminate Phospholipase A, with the consequent loss of elements involved in maintaining sperm functions. **Objective:** Determine the adequate concentration of egg yolk (YH) for freezing goat semen in a lyophilized diluent based on Tris-glucose and citric acid, without performing seminal washing by centrifugation. **Methodology:** ninety ejaculates were evaluated with 12 replicates, collected twice a week by means of Artificial Vagina. Volume, motility, concentration, viability and total pathologies were measured. The fit ejaculates were united and divided into five portions, each one received the corresponding diluent: Tris-glucose-Ac. Citrus with YH (2.25%, 3.37%, 4.45% and 5.65%) and the control diluent containing lactose-skimmed milk (DC). The final sperm concentration in the samples was  $1.5 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . The equilibrium period was carried out at 5°C for 2 h. Subsequently, it was frozen in 0.1 mL tablets in nitrogen vapors, and stored for 7 d in liquid nitrogen, thawed at 37°C and the percentages of motility (30 min, 120 min and 240 min), viability and total pathologies (30 min and 120 min) were determined. The diluents were compared using a Binary Logistic Regression model. **Results:** YH (4.45%) and DC had the highest probability ( $P < 0.05$ ) of motility at all times. The highest probability ( $P < 0.05$ ) of viability was for YH (4.45%), and the lowest probability ( $P < 0.05$ ) of total pathologies for 4.45% YH and DC, at 30 min and 120 min. **Implications:** In the freezing of goat semen, it is possible to eliminate the seminal washing process by centrifugation. **Conclusion:** Goat semen can be frozen in a Tris-based lyophilized extender with 4.45% egg yolk, without performing seminal washing by centrifugation.

**Key words:** Goat semen; cryopreservation; seminal plasma.

### RESUMEN

**Antecedentes:** Previo a la congelación del semen caprino, es necesario realizar el lavado seminal por centrifugación para eliminar la Fosfolipasa A, con la consecuente pérdida de elementos involucrados en el mantenimiento de las funciones del espermatozoide. **Objetivo:** Determinar la concentración de yema de huevo (YH) adecuada, para la congelación del semen caprino en un diluyente liofilizado a base de Tris-glucosa y ácido cítrico, sin realizar el lavado seminal por centrifugación. **Metodología:** se evaluaron 90 eyaculados con 12 réplicas, colectados dos veces por semana mediante Vagina Artificial. Se midieron volumen, motilidad, concentración, viabilidad y patologías totales. Los eyaculados aptos, fueron unidos y divididos en cinco porciones, cada una recibió el diluyente correspondiente: Tris-glucosa-Ac. Cítrico con YH (2.25%, 3.37%, 4.45% y 5.65 %) y el diluyente control conteniendo lactosa-leche descremada (DC). La concentración espermática final en las muestras fue de  $1.5 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Se realizó el período de equilibrio a 5°C durante 2 h. Posteriormente se congeló en pastillas de 0.1 mL en vapores de nitrógeno, y se almacenaron por 7 d en nitrógeno líquido, se descongelaron a 37°C y se determinaron los porcentajes de motilidad (30 min, 120 min y 240 min), viabilidad y patologías totales (30 min y 120 min). Los diluyentes fueron comparados mediante un modelo de Regresión Logística Binaria. **Resultados:** YH (4.45%) y DC presentaron la mayor probabilidad ( $P < 0.05$ ) de motilidad en todos los tiempos. La mayor probabilidad ( $P < 0.05$ ) de viabilidad fue para YH (4.45%), y la menor probabilidad ( $P < 0.05$ ) de patologías totales para 4.45% YH y DC, a 30 min y 120 min. **Implicaciones:** En la congelación del semen caprino es posible eliminar

† Submitted October 4, 2021 – Accepted January 27, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4011>



el proceso de lavado seminal por centrifugación. **Conclusión:** El semen caprino puede congelarse en un diluyente liofilizado a base de Tris con 4.45% de yema de huevo, sin realizar el lavado seminal por centrifugación.

**Palabras claves:** Semen caprino; crio-preservación; plasma seminal.

## INTRODUCCIÓN

El semen del macho caprino a diferencia de otras especies, posee un alto contenido de Fosfolipasa A, enzima que se produce en las glándulas bulbouretrales y actúa sobre las lecitinas de la yema de huevo o los lípidos residuales de la leche (Nethenzheni *et al.*, 2021; Tibary and Manar, 2018), ambos son adicionados al diluyente como protectores de la membrana espermática contra el choque frío (5°C) y actúan durante el período de equilibrio previo a la congelación. La reacción enzimática que se produce origina ácidos grasos libres, lisolecitinas y fosfolípidos, sustancias que producen la coagulación del medio y tienen efecto espermicida, originando reducción en la motilidad, inmovilización y muerte espermática (Gangwar *et al.*, 2016).

Este efecto negativo, puede suprimirse realizando el lavado por centrifugación, donde se elimina la fosfolipasa A, pero también se pierden los elementos presentes en el plasma seminal (proteínas, enzimas, sales, fructosa, etc.) necesarios para mantener las funciones del espermatozoide (Anand *et al.*, 2017; Sharma and Sood, 2019). Ritar and Salamon (1982), en un medio a base de Tris-glucosa-ácido cítrico, sin realizar el lavado seminal, lograron minimizar el efecto de esta reacción enzimática utilizando bajos porcentajes de yema de huevo.

La liofilización constituye la forma más apropiada para conservar un diluyente, aunque durante este proceso las proteínas experimentan desnaturalización por enfriamiento. Una vez concluida, se logra estabilidad física, química y biológica por períodos prolongados. Sin embargo, el éxito del procedimiento depende de la selección de los componentes y la asociación de sus propiedades físicas (Remmele *et al.*, 2012).

Los diluyentes contienen compuestos similares que obedecen a principios básicos, válidos para todas las especies, el proceso de crioconservación requiere de la selección adecuada de cada componente y en la proporción precisa, sin olvidar que cada especie requiere un protocolo específico acorde a sus particularidades (Sharma and Sood, 2020).

El objetivo del presente trabajo es determinar la concentración de yema de huevo (YH) adecuada, para la congelación del semen caprino en un diluyente liofilizado a base de Tris-glucosa y ácido cítrico, sin realizar el lavado seminal por centrifugación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Tecnología del Semen del Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), ubicado en La Habana, Cuba.

### Animales

Se utilizaron como donantes del esperma, sementales caprinos de las razas Saanen (2), Alpina (3) y Boer (6), con una edad entre 3 años a 5 años, estabulados, ubicados individualmente y con una alimentación controlada y estable, a base de concentrados (1 kg diario/animal.) forraje verde (5 kg diarios/animal 2 veces al día), sales minerales y agua *ad libitum*.

### Colecta y evaluación del semen

Fueron procesados 90 eyaculados en 12 réplicas, la colecta de semen se realizó dos veces por semana mediante Vagina Artificial, siempre en presencia de una hembra en celo; inmediatamente después se valoró el volumen (mL) mediante colector graduado, la motilidad (%) por valoración al microscopio con un aumento de 40x, la concentración espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) mediante conteo en cámara de Neubauer, la viabilidad (% de vivos) por tinción con eosina-nigrosina y las patologías totales (%), utilizando un microscopio de contraste de fase. Los eyaculados clasificados como aptos para ser procesados (volumen  $\geq 0.5\text{mL}$ ; motilidad  $\geq 80\%$ ; concentración espermática  $\geq 3000 \times 10^6/\text{mL}$ ; viabilidad  $\geq 80\%$  y patologías totales  $\leq 20\%$ ), fueron unidos en un pool el cual fue dividido en cinco porciones.

### Diluyoconservadores

Se utilizó un diluyente liofilizado no comercial (D) a base de Tris (4.4g), Ácido Cítrico (2.3g), Glucosa (0.74g) y Glicerol al 6% (v/v), con cuatro concentraciones de yema de huevo (D1:2.25%; D2:3.37%; D3:4.45% y D4:5.65%); y el diluyente control (DC), compuesto por lactosa (4g), leche descremada (10g), DMSO al 0.2% (v/v) y Glicerol al 6% (v/v); en todos los diluyentes se utilizó, la combinación penicilina con estreptomycin (1000 UI  $\text{mL}^{-1}$  y 1000 mg  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente), como antimicrobianos. El volumen de cada medio liofilizado fue restituido, con agua destilada a 37°C. Cada porción de eyaculado recibió el diluyente correspondiente según los cálculos realizados para la dilución y según el método de congelación a utilizar (lavado por centrifugación o no).

## Dilución del semen

Cuando se utilizó el diluyente liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico-Glicerol y yema de huevo, en sus cuatro concentraciones, el semen fue diluido lo más rápido posible después de la colecta, según los cálculos de dilución, sin realizar lavado. Cuando se utilizó el diluyente liofilizado a base de lactosa-leche descremada y glicerol (DC), después de la evaluación del eyaculado, se eliminó el plasma seminal mediante el lavado por centrifugación (2500 rpm, durante 15 min.) en solución ODT (Duverger *et al.*, 1985) en una relación de volumen 1:9 (v/v; semen:ODT), posteriormente se descartó totalmente el sobrenadante, utilizando una pipeta Pasteur y se le añadió el diluyente según los cálculos de dilución. La concentración espermática en todas las muestras fue de  $1.5 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ .

## Período de equilibrio

Inmediatamente después de la dilución, se colocó cada muestra en un recipiente con agua a 37°C y se trasladaron al refrigerador a 5°C durante 2 h para el descenso gradual de la temperatura.

## Congelación del semen

La congelación del semen se realizó en pastillas de 0.1 mL en vapores de nitrógeno, por goteo sobre una placa de acrílico situada a 4 cm de la superficie del mismo, transcurrido 2 min., las pastillas de semen congeladas fueron depositadas en un glover previamente identificado (código del semental, fecha de congelación, especie, medio de congelación, # de dosis) y almacenadas en un termo con nitrógeno líquido hasta su descongelación.

## Descongelación

Se utilizó un baño María con control de temperatura, se depositó una pastilla de cada muestra congelada en un tubo de ensayo con 1mL de solución descongelante (Citrato de Sodio al 1.94% y Bromuro de Potasio al 0.66%) a 37°C, agitándose hasta su descongelación.

## Evaluación del semen descongelado (Test de incubación)

Las muestras permanecieron en Baño María a 37°C para determinar porcentaje de motilidad (30 min, 120 min y 240 min), porcentaje de espermatozoides vivos (viabilidad) y porcentaje de patologías espermáticas totales (30 min y 120 min).

## Análisis estadístico

Las variables motilidad, viabilidad (vivos) y patologías totales se analizaron utilizando un modelo de regresión logística binaria mediante el software estadístico Minitab 19 (2019), ajustándose un modelo con dos predictores categóricos: el diluyente

y el tiempo transcurrido, y como variable de respuesta la opción de que el espermatozoide presente motilidad, viabilidad (% de vivos) y patologías (%).

La probabilidad de ocurrencia de dichos eventos se determinó mediante el siguiente modelo:

$$P(\text{respuesta}) = \exp(Y') / (1 + \exp(Y'))$$

Donde: P(respuesta), es la probabilidad de que haya motilidad, viabilidad (vivos) o patologías en el semen;

Y' es una modelo lineal de regresión con  $n_i + 1$  parámetros, en donde  $n_i$  corresponde al i-ésimo número de niveles para los tipos de diluyentes y los tiempos.

Para determinar si existe diferencia entre las predicciones para cada uno de los modelos, se utilizó el intervalo de confianza de cada una de dichas predicciones.

Se graficaron los porcentajes promedio para cada nivel de concentración del diluyente en los diversos tiempos probados, agregando al gráfico la tendencia de regresión que más se ajusta al comportamiento de la variable de respuesta en cada caso.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se compara la probabilidad de motilidad espermática post descongelación entre los diluyentes a base de YH en sus cuatro diferentes concentraciones y el DC durante el test de incubación; a los 30 min, la mayor probabilidad ( $P < 0.05$ ) de motilidad se presentó con la concentración de 4.45% de YH y el Control (0.39 y 0.37, respectivamente), la probabilidad de motilidad para las concentraciones de 2.25% y 5.65% (0.34 y 0.33, respectivamente) fueron iguales ( $P > 0.05$ ) y menores que los tratamientos anteriores, la concentración de 5.65% presentó la menor motilidad (0.30). A los 120 min la tendencia de respuesta fue similar, excepto porque la probabilidad de motilidad con la concentración de 4.45% fue superior ( $P < 0.05$ ) que la obtenida con el control (0.37 y 0.34, respectivamente). A 240 min la tendencia de respuesta fue igual que a 120 min, aunque con tendencia a disminuir en todos los tratamientos.

En la Figura 2, se muestra la tendencia del comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje de motilidad espermática durante el test de incubación; a los 30 min y 120 min, la respuesta fue cuadrática, incrementándose la motilidad de la concentración del 2.25 % hasta su punto más alto cercano al 4.45% de concentración, para luego descender al nivel de concentración de YH (5.65%). Este comportamiento se mantuvo a 120 min (31.67%, 31.67%, 35.83% y 26.25%) y a 240 min la motilidad presentó tendencia cúbica (22.5%,

20.83%, 30.0% y 20.24%) para D1, D2, D3 y D4, respectivamente.

En la Figura 3, se comparó la probabilidad de viabilidad espermática post descongelación entre los diluyentes a base de YH en sus cuatro diferentes concentraciones y el DC durante el test de incubación. La mayor probabilidad ( $P < 0.05$ ) de viabilidad espermática a 30 min fue para D3 (4.45% YH), seguida de D2 (3.37% YH), que resultó estadísticamente superior ( $P < 0.05$ ) que DC, D1 (2.25% YH) y D4 (5.65% YH), que a su vez resultaron estadísticamente iguales entre sí. La concentración 2.25% de YH (menor) y 5.65% de YH (mayor) mostraron la probabilidad de viabilidad espermática más baja. El comportamiento para la viabilidad espermática que se observó en las diferentes concentraciones a 30 min, se mantuvo a 120 min.

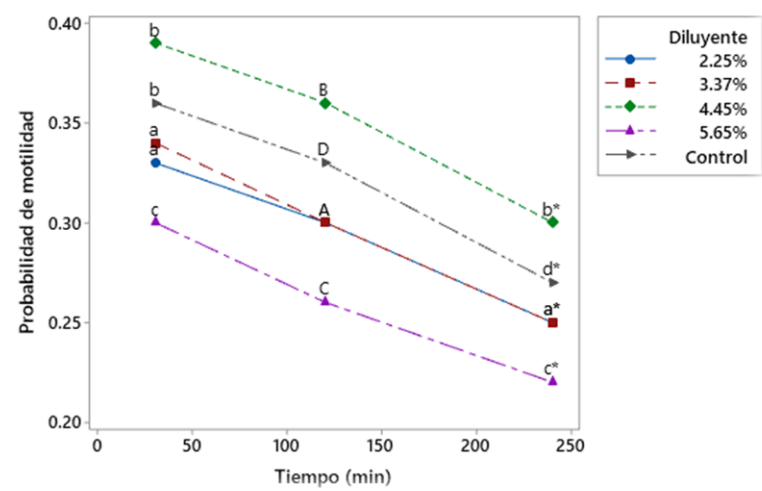
En la Figura 4, se muestra la tendencia del comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje de viabilidad espermática durante el test de incubación, la tendencia en 30 min y 120 min fue cuadrática, se observa que en la medida que se incrementó el nivel de YH, aumentó el porcentaje de viabilidad espermática post descongelación (34.5%, 38.33% y 44.08% respectivamente). Sin embargo, cuando la concentración fue de 5.65% YH, la viabilidad disminuye (35.33%). El comportamiento de la viabilidad espermática se mantuvo a 120 min (30.66%, 33.83%, 41.41% y 30.5%) para D1, D2, D3 y D4, respectivamente.

En la Figura 5, se comparó la probabilidad de patologías espermáticas totales post descongelación entre los diluyentes a base de YH en sus cuatro diferentes concentraciones y el DC durante el test de incubación, a 30 min, la menor probabilidad de patologías espermáticas totales se corresponde con D3 (4.45% YH) y DC (Control), quienes entre sí, fueron estadísticamente iguales ( $P > 0.05$ ) seguidos de D2 (3.37% YH), D1 (2.25% YH) y D4 (5.65% YH) con mayor probabilidad de patologías totales. Este mismo comportamiento se presentó a 120 min.

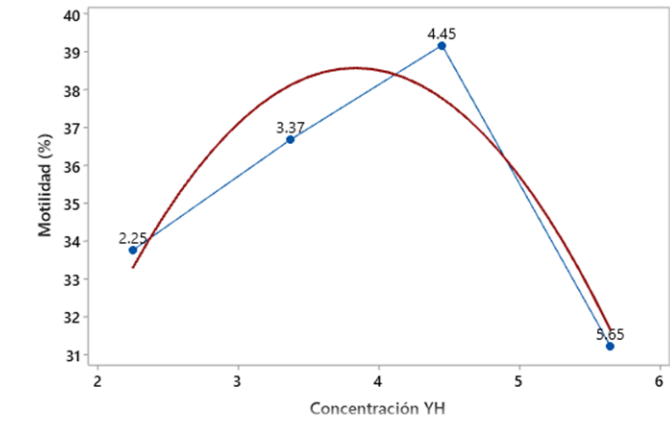
En la Figura 6 se muestra el comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje

de patologías espermáticas totales durante el test de incubación. A los 30 min, se observa que en la medida que se incrementó el nivel de YH (2.25%, 3.37% y 4.45% respectivamente), disminuyó el porcentaje de patologías espermáticas totales post descongelación (36.25%, 30.25% y 20.25%, respectivamente); para luego incrementarse al valor mas elevado (42.83%), precisamente con D4 que coincide con la mayor concentración de YH (5.65%), este comportamiento se mantuvo a 120 min (31.67%, 31.67%, 35.83% y 26.25%), para D1, D2, D3 y D4, respectivamente.

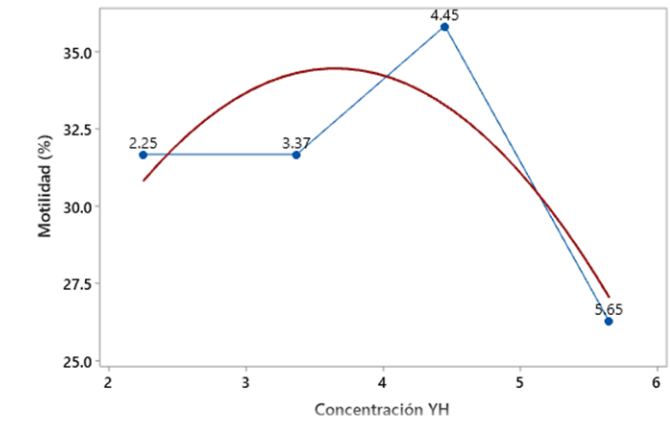
Al analizar el comportamiento de la motilidad y viabilidad espermática post descongelación entre los diluyentes a base de YH en sus cuatro diferentes concentraciones, se observa que los porcentajes más bajos son para el nivel 2.25% de YH (D1), al respecto Yodmingkwan *et al.* (2016), en un medio a base de Tris con 2.5% de YH, observan resultados post descongelación muy inferiores a los obtenidos en el presente estudio para motilidad (9.93%) y viabilidad espermática (10.38%), los cuales lo adjudican a la baja concentración de YH utilizada, sin embargo, pudiera estar más relacionado con el bajo porcentaje de glicerol (crioprotector) incorporado (1.4%), que es muy inferior a al recomendado por la literatura internacional (5% - 8%) para la crioconservación del semen de esta especie (Bóveda *et al.*, 2020; Sharma and Sood, 2020b). Gojen *et al.* (2016), declaran porcentajes de motilidad y viabilidad más elevados que los nuestros, con un diluyente de composición similar y 2.5% de YH comparado con 5.0%, 7.5% y 10%; esta divergencia de criterios podría explicarse teniendo en cuenta que D1, D2, D3 y D4 fueron liofilizados y se conoce que durante la liofilización, pueden perderse hasta el 50% de las propiedades protectoras del producto (Watson, 1976) debido a la naturaleza altamente energética del proceso, donde se producen cambios de composición en los biomateriales a preservar, lo que hace que las muestras procesadas sean vulnerables a la desnaturalización (Merivaara *et al.*, 2021; Remmele *et al.*, 2012). Analizando estos criterios es posible que concentración de 2.25% de YH (D1) sea insuficiente para brindar protección contra el choque frío durante el periodo de equilibrio



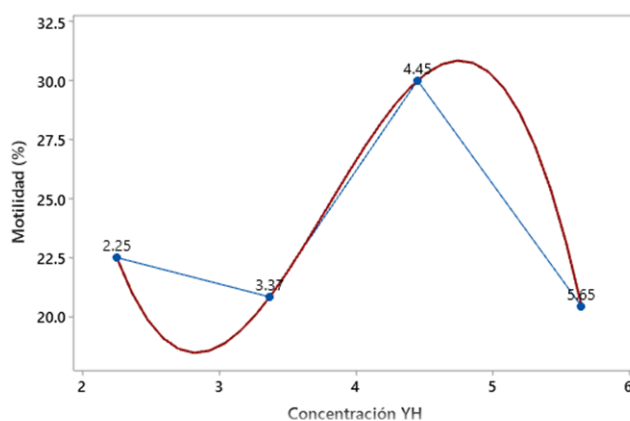
**Figura 1.** Efecto de la concentración de YH y DC sobre la probabilidad de motilidad espermática durante el test de incubación. Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).



30 min



120 min



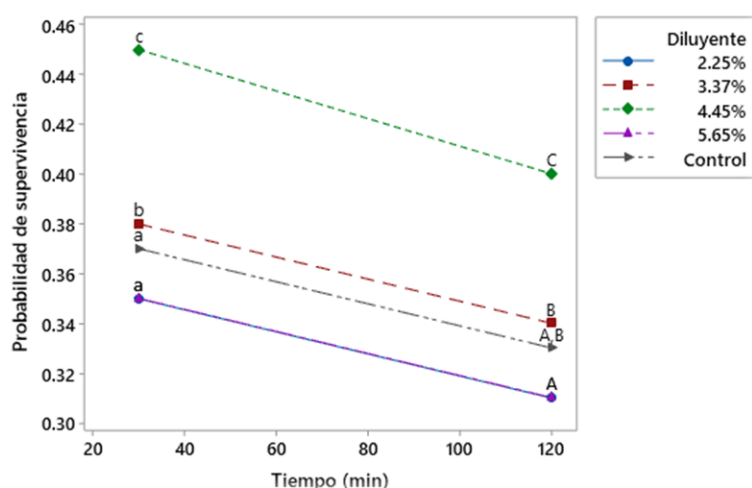
240 min

**Figura 2.** Comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje de motilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, durante el test de incubación (30 min, 120 min y 240 min).

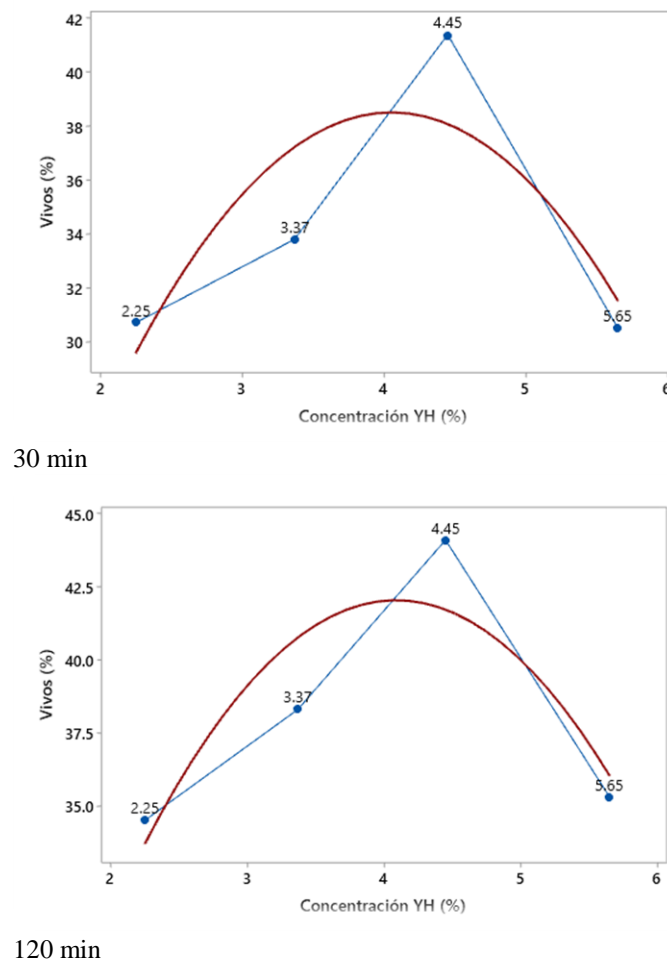
y esto explicaría los bajos porcentajes de motilidad (33.7%, 31.6% y 22.5% a los 30 min, 120 min y 240 min, respectivamente) y viabilidad espermática (34.5% y 30.6% a 30 min y 120 min) obtenidos en el test de incubación post descongelación con el D1.

Al analizar el D2, que presenta un 3.37% de yema de huevo, los resultados para motilidad y viabilidad espermática post descongelación se incrementan, al parecer esta concentración le confiere a la membrana espermática, cierta protección, pero aún insuficiente. Sin embargo, al continuar incrementando hasta 4.45% de yema de huevo (D3), se presentan los porcentajes más elevados así como la mayor probabilidad para ambos parámetros (motilidad y viabilidad espermática) y los valores de patologías totales más bajos, lo que demuestra que es el nivel adecuado que le confiere la protección necesaria

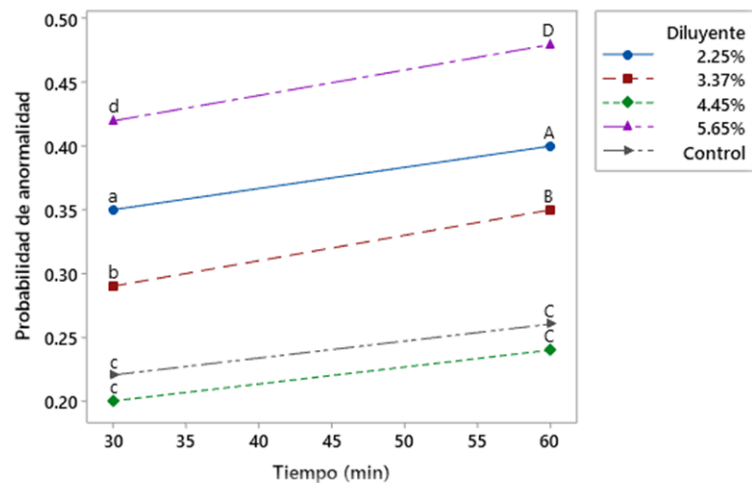
contra el choque frío y a su vez la reacción enzimática entre la fosfolipasa A y la lecitina de la yema de huevo se está produciendo porque ambas están presentes pero a nivel tal que no causa el deletéreo de la población espermática. Resultados similares fueron obtenidos por Yimer *et al.* (2014), quienes utilizaron 2.5%, 5% y 10% de yema de huevo para la congelación de semen caprino en pajuelas sin realizar lavado seminal y observan un incremento en los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática conforme se incrementó el nivel de yema de huevo, esto pudiera explicarse porque una de las formas de minimizar la reacción enzimática es ampliando la dilución y en este caso la pajuela de 0.25mL tiene concentración espermática de  $50 \times 10^6$ , comparado con los  $150 \times 10^6$  en un volumen de 0.1mL de la pastilla, por lo que es evidente que la concentración de la enzima es menor



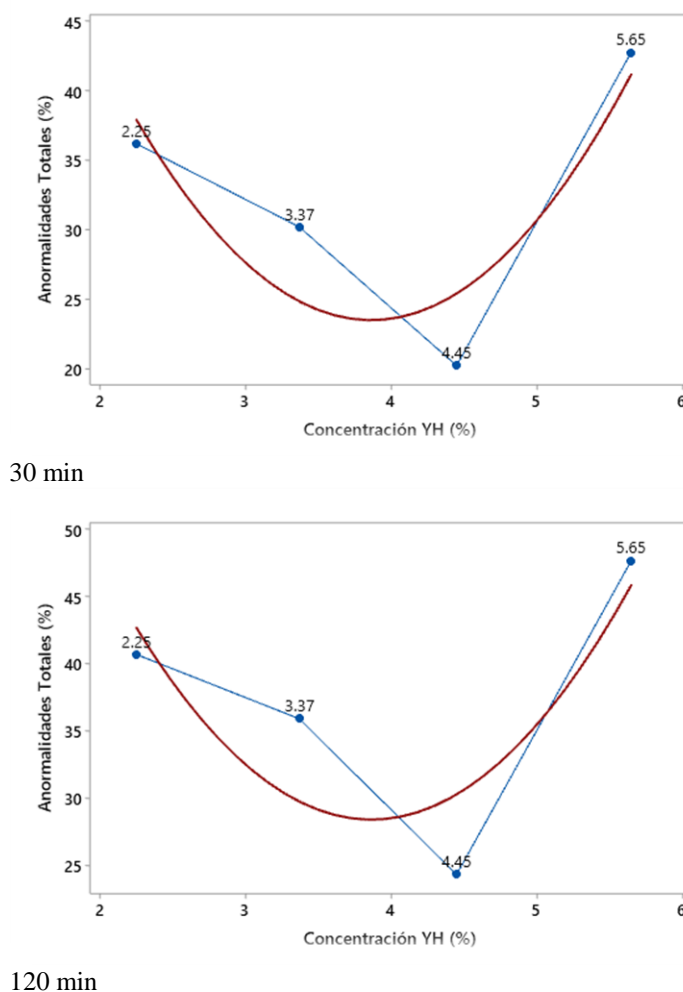
**Figura 3.** Efecto de la concentración de YH y el DC sobre la probabilidad de viabilidad espermática durante el test de incubación Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje de viabilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, durante el test de incubación (30 min y 120 min).



**Figura 5.** Efecto de la concentración de YH y DC sobre la probabilidad de patologías espermáticas totales durante el test de incubación. Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 6.** Comportamiento de la concentración de yema de huevo sobre el porcentaje de patologías espermáticas totales del semen caprino congelado-descongelado, durante el test de incubación (30 min y 120 min).

en la pajuela. Se han utilizado con éxito tasas de dilución de 1:1 – 1:23 (v/v; semen-diluyente), aunque la mejor manera de diluir el semen, con fines comparativos, es teniendo en cuenta la concentración de esperma (Purdy, 2006).

En el caso del D4, que se corresponde con la mayor concentración de YH (5.65%), se observa una caída brusca en la motilidad y en la viabilidad espermática, así como mayores porcentajes de patologías totales. Este comportamiento podría estar influenciado por la fosfolipasa A presente en el plasma seminal, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo y produce ácidos grasos y lisolecitina, los primeros, causan la disminución del pH del semen diluido, lo cual reduce la viabilidad de los espermatozoides, mientras que la lisolecitina tiene un efecto tóxico sobre la motilidad de los espermatozoides y la integridad de la membrana celular espermática, lo que también reduce la capacidad para fertilizar, esta reacción enzimática es más intensa en la medida que aumenta la concentración de YH (Dhafer y Aziz, 2021; Moreno *et al.*, 2021; Sharma y Sood, 2020). Resultados similares fueron observados por Ferreira *et al.* (2014), quienes señalan que un 5% de YH proporcionó mejores resultados de motilidad y viabilidad, en comparación con el semen procesado

en un diluyente con un 10% de YH sin realizar lavado seminal.

En el plasma seminal del caprino también se encuentra una familia de proteínas aglutinantes de esperma denominadas BSP, que son secretadas por las vesículas seminales (Manjunath, 2012); después de la eyaculación, se unen a la membrana espermática y comienzan a sustraer de la bicapa, fosfolípidos y colesterol, ambos, componentes asociados con la estabilidad de la membrana y que determinan la resistencia de ésta al choque frío y la congelación (Peris-Frau *et al.*, 2020). La protección de la YH, es atribuida a sus lipoproteínas de baja densidad (LDL), quienes inmediatamente después de la dilución, comienzan a secuestrar las proteínas BSP del plasma seminal, disminuyendo la cantidad disponible para unirse a la membrana espermática y por tanto se minimiza el efecto deletéreo que causan por la salida del colesterol y fosfolípidos de la membrana (Agossou y Koluman, 2018). Además, los lípidos presentes en las LDL forman una barrera que protege la membrana contra el choque frío y reemplazan los fosfolípidos de la membrana que se pierden continuamente durante el proceso de congelación-descongelación, por lo que el



mecanismo de protección de los espermatozoides por la YH, implica el secuestro de las proteínas BSP por las LDL presente en la YH, es decir una interacción proteínas BSP - lipoproteína (Zamiri, 2020).

En el DC, donde se realizó el lavado seminal por centrifugación, a 30 minutos post descongelación, la probabilidad para la motilidad espermática fue menor que D3, sin diferencias significativas entre ambos ( $P>0.05$ ) pero mayor que el resto de los diluyentes, de los que difiere estadísticamente ( $P<0.05$ ). A los 120 min y 240 min la probabilidad de motilidad disminuye, siendo estadísticamente diferente ( $P<0.05$ ), menor que D3 y mayor al resto de los diluyentes. Sin embargo, en el caso de la viabilidad espermática, DC fue estadísticamente igual ( $P>0.05$ ) a D4 quien mostró la menor probabilidad para este parámetro comparada con el resto de los diluyentes ( $P<0.05$ ).

El diseño del DC presenta una combinación de crioprotectores penetrantes y no penetrantes (glicerol, DMSO, lactosa y leche descremada), cada uno de estos componentes juega un importante papel en el proceso de crioconservación. El glicerol y el DMSO, al ser moléculas de bajo peso molecular, son capaces de atravesar la membrana espermática e inducen la deshidratación celular (Elliott *et al.*, 2017). La lactosa, es un azúcar de alto peso molecular que no puede difundirse a través de la membrana plasmática, pero igualmente propicia la deshidratación celular, lo cual disminuye la probabilidad de formación de hielo intracelular y favorece la supervivencia espermática a la criopreservación (Gangwar *et al.*, 2016; Raju *et al.*, 2021). Por su parte, los lípidos de la leche, forman una película protectora en la superficie del espermatozoide y además reemplazan los fosfolípidos de la membrana espermática que se pierden o dañan durante el proceso de criopreservación (Manjunath, 2012), al tiempo que mantienen la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides, no solo durante el choque frío del período de equilibrio, sino también en la congelación y descongelación (Moura *et al.*, 2018; Pini *et al.*, 2018). A pesar de los mecanismos protectores que posee el DC, los resultados en los parámetros seminales post descongelación, son inferiores al D3, donde no se realizó el lavado por centrifugación para eliminar el plasma seminal.

El lavado seminal por centrifugación puede afectar la población espermática, los espermatozoides dañados o muertos en este proceso aumentan significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Daramola, 2017; Silva *et al.*, 2021; Gojen *et al.*, 2016; Tabarez *et al.*, 2017), y el sitio primario donde se manifiesta el daño inducido por estas, es la membrana plasmática de los espermatozoides, que experimenta cambios conformacionales en su integridad y propiedades semipermeables, con la consiguiente pérdida de motilidad (Aitken, 2020; Kumar *et al.*, 2019).

Algunos autores coinciden con nuestro criterio de no eliminar el plasma seminal, su presencia es beneficiosa si en la criopreservación se asocia al componente adecuado y en la proporción correcta (Ugur *et al.*, 2019; Nethenzheni *et al.*, 2021).

El plasma seminal contiene gran cantidad de enzimas antioxidantes que incluyen la superóxido dismutasa y catalasa, quienes regulan la sobreproducción de ROS durante el descenso de la temperatura y la congelación (Kopeika *et al.*, 2015; Zamiri, 2020). Este sistema antioxidante actúa como mecanismo de defensa para mantener la calidad del espermatozoide, y a través de sus enzimas antioxidantes protege la estructura de la célula espermática y previene el aumento de anomalías derivadas del proceso de crioconservación (Baghel *et al.*, 2016).

La composición del diluyocrioprotector es importante, y determina la calidad del semen después de la descongelación (Wahjuningsih *et al.*, 2019). En este estudio, los mejores resultados se obtienen con el D3 compuesto por Tris-ácido cítrico-glucosa-glicerol-YH, cada uno de estos componentes tiene una función específica y proporcionan los mecanismos de protección contra los daños producidos en el proceso de crioconservación. La combinación Tris-ácido cítrico, está descrita como el mejor sistema tampón en el diluyente para el semen caprino (Gangwar *et al.*, 2016; Sharma y Sood, 2019; Sharma y Sood, 2020). La glucosa, es un sustrato excelente que proporciona la energía necesaria para el metabolismo espermático, al ser una molécula de pequeño tamaño (monosacárido), puede atravesar la membrana y actuar como crioprotector interno, minimizando la formación de hielo intracelular lo que conduce a una mayor viabilidad después de la criopreservación (Yodminkwan *et al.*, 2016; Narwade *et al.*, 2017; Zakiya *et al.*, 2020). El glicerol, es reconocido como el mejor crioprotector y el más utilizado en esta especie, cuando ingresa al interior de la célula espermática, se une a la molécula de agua, provoca un estado de gel y produce un descenso en el punto de congelación lo que evita la formación de hielo intracelular, además favorece el reordenamiento de lípidos y proteínas de la membrana, lo que aumenta su fluidez, favorece la deshidratación a temperaturas más bajas, y provee una mayor capacidad para sobrevivir a la criopreservación (Hezavehei *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021). La concentración de YH al 4.45%, sugiere ser la más adecuada y al parecer es suficiente para bloquear las proteínas BSP, a la vez que protege la membrana espermática contra el choque frío sin que la reacción enzimática entre la fosfolipasa A y las lecitinas, cause el deterioro de la población espermática, precisamente por la baja concentración de YH.

La motilidad espermática post descongelación, es el mejor indicador para evaluar la calidad del semen crioconservado y su habilidad de fertilización (Sun

*et al.*, 2020). En este sentido, los resultados varían desde el 20% al 60% (Memon *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2018; Tekin y Daskin, 2016; Vidal *et al.*, 2013), la diferencia podría estar dada precisamente en la presencia o no del plasma seminal.

En el presente experimento, no se realizó el lavado seminal, con ninguna de las combinaciones del diluyente a base de Tris, por lo tanto, todas las muestras que contenían YH fueron congeladas en presencia del plasma seminal. Se puede atribuir que este fluido, resultado de secreciones de varios órganos del tracto genital masculino (epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas bulbo-uretrales), tiene solamente la función de transporte de espermatozoides sin ningún otro papel biológico importante, pero la complejidad de su composición, (proteínas, azúcares y lípidos), demuestra su misión biológica, en el mantenimiento de las funciones vitales de los espermatozoides post-eyaculación, para finalmente asegurar la fecundación en la hembra (Druart y de Graaf, 2018)

### CONCLUSIONES

Es posible, la criopreservación del semen caprino sin realizar el lavado seminal por centrifugación utilizando un diluyente liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico con 4.45% de yema de huevo.

#### Agradecimientos

Agradecemos al CIMAGT por el apoyo para la realización del presente trabajo

**Funding.** There was no external funding for this work.

**Conflict of interests.** The authors declare that they have not conflict of interest.

**Compliance with ethical standards.** The authors declare that articles 47-52 of Chapter VIII of Decree Law No. 31 on Animal Welfare of the Republic of Cuba were fully complied with.

**Data availability.** The data is available with the corresponding author ([palacios@uabcs.mx](mailto:palacios@uabcs.mx)) upon request.

**Author contribution statement (CRediT).** J. Martínez-Duran. Conceptualization, Investigation, writing, original draft, O. Duverger-Tellez. Methodology, Investigation, N. Díaz-Martínez. Methodology, Investigation, L. Interian-Alvarez. Methodology, Investigation, R. Denis-García. Conceptualization, Methodology, A. Palacios-Espinosa. Formal Analysis, writing original draft, writing review and editing.

### REFERENCIAS

- Agossou, D.J. and Koluman, N., 2018. The effects of natural mating and artificial insemination using cryopreserved buck semen on reproductive performance in Alpine goats. *Archives Animal Breeding*, 61(4), pp. 459-461. <http://doi.org/10.5194/aab-61-459-2018>.
- Aitken, R.J., 2020. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*, 159(4), pp. 189-201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
- Anand, M., Baghel, G. and Yadav, S., 2017. Effect of egg yolk concentration and washing on sperm quality following cryopreservation in Barbari buck semen. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), pp. 560-565. <http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2016.1232265>
- Baghel, G., Anand, M. and Yadav, S., 2016. Evaluate the effect of egg yolk and seminal plasma on spermatozoa abnormality using different cryopreservation protocol in Barbari buck semen. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 5(2), pp. 666-671. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.8>
- Bóveda, P., Toledano, A., Castaño, C., Estes, M., Lopez-Sebastian, A. and Rizos, D., 2020. Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLOS ONE*, 15(1), pp. 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Daramola, J.O., 2017. Effect of centrifugation on motility, sperm capacitation and acrosome reaction in soy bean and avocado seed milk extenders of cryopreserved goat spermatozoa. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 50(1), pp. 13-18. <https://doi.org/10.1515/ats-2017-0002>
- Dhafer, N.N. and Aziz, D.M., 2021. The influence of semen collection frequency on deleterious the interaction between the enzymes of the bulbourethral gland and egg yolk during the dilution of buck semen. *Intern. Journal of Veterinary Science*, 4(1), pp. 10-8. <https://doi.org/10.21608/svu.2021.40564.107>
- Duverger, O., Carmenate, C. and Barba, F., 1985. Resultados de fertilidad en semen fresco ovino utilizando una nueva fórmula. *VII Jornada Científica CIMA*, C. Habana, 8-9 Nov.
- Elliott, G.D., Wang, S. and Fuller, B.J. 2017., Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low

- temperatures. *Cryobiology*, 70, pp. 74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
- Ferreira, V.S., Mello, M.R.B., Fonseca, C.E.M., Diaz, A.C.F., Cardoso, J.M., Silva, R.B. and Junior, W.P.M., 2014. Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(10), pp. 513-518. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014001000001>
- Gangwar, C., Kharche, S.D., Kumar, S. and Jindal, S.K., 2016. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. *Indian Journal of Small Ruminants*, 22(1), pp. 1-10. <https://doi.org/10.5958/0973-9718.2016.00005.2>
- Gojen, L., Ray, K. and Sarkar, B., 2016. Effect of different levels of egg yolk on cryopreservation of Black Bengal buck semen in Tris egg yolk citrate fructose glycerol extender. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(1), pp. 101-106.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V. and Shahverdi, A., 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(3), pp. 327-339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Huang, Z., Gao, L., Hou, Y., Zhu, S. and Fu, X., 2019. Cryopreservation of farm animal gametes and embryos: recent updates and progress. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 6(1), pp. 42-53. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018231>
- Kopeika, J., Thornhill, A. and Khalaf, Y., 2015. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, 21(2), pp. 209-227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
- Kumar, A., Prasad, J.K., Srivastava, N. and Ghosh, S.K., 2019. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), pp. 603-612. <http://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Manjunath, P., 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction*, 9(4), pp. 809-815.
- Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M. and Nadia, F.M., 2013. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, pp. 325-330. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02155.x
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandez, F. and Yliperttula, M., 2021. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*, 336, pp. 480-498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>
- Minitab 19 Software estadístico., 2019. State College, Pensilvania: Minitab, Inc. [www.minitab.com](http://www.minitab.com)
- Moreno, S., Veliz, F., Calderón, G., Contreras, V., Guillen, J. and Ángel, O., 2021. Determination of the quality of semen cryopreserved with soy lecithin or egg yolk, in male goats. *Abanico Veterinario*, 11, pp. 1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.8>
- Moura, A.A., Memili, E., Rodrigues, A.M., Guedes, A., Cazaux, A.L., Barbosa, M.J. and Vasconcelos, F.R., 2018. Seminal plasma proteins and metabolites: effects on sperm function and potential as fertility markers. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)*; Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0029.
- Narwade, B.M., Mohanty, T.K., Bhakat, M. and Rahim, A., 2017. Goat semen cryopreservation using egg yolk and soya based extenders containing trehalose. *Indian Journal of Animal Science*, 87(7), pp. 851-855.
- Nethenzheni, L.P., Mphaphathi, M.L., Madzhie, L.R., Negota, N.C., Kalonji, P.V.M., Nedambale, T.L. and Barry, D.M., 2021. Effect of Bioxcell® and Triladyl® extenders and removal of seminal plasma on equilibrated and cryopreserved semen from South African unimproved indigenous bucks. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 8(1):1164 ISSN:2471-0172. DOI:10.26420/jbacteriolmycol.2021.1164
- Peris-Frau, P., Soler, A.J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D.A., Fernández-Santos, M.R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V. and Garde, J.J., 2020. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), pp. 2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>

- Pini, T., Leahy, T. and de Graaf, S.P., 2018. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology*, 118, pp. 172-181. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.06.006
- Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63, pp. 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Rahman, M.S., Gofu, M.R., Rahman, M.M., Bari, F.Y. and Juyena, N.S., 2018. Effect of skim milk and tris-citrate extenders to preserve the semen of indigenous ram of Bangladesh. *Asian Journal of Biology*, 5(2), pp. 1-11. <https://doi.org/10.9734/AJOB/2018/39448>
- Raju, R., Bryant, S.J., Wilkinson, B.L. and Bryant, G., 2021. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1865, 129749. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129749>
- Remmele, R.L., Sampathkumar, K. and Callahan, W.J., 2012. Development of Stable Lyophilized Protein Drug Products. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(3), pp. 471-496. <https://doi.org/10.2174/138920112799361990>
- Ritar, A.J. and Salamon, S., 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35, pp. 305-312. <https://www.publish.csiro.au/bi/pdf/BI9820305>
- Sharma, A. and Sood, P., 2019. Cryopreservation and fertility of frozen thawed Chegu goat semen. *Indian Journal of Animal Research*, 53(11), pp. 1414-1419. DOI: 10.18805/ijar.B-3696
- Sharma, A. and Sood, P., 2020. Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 6(1), pp. 46-57. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.vsr/2020/6.1.46.57>
- Sharma, A., Sood, P. and Chaudhary, J.K., 2020b. Comparative efficacy of different concentrations of egg yolk for cryopreservation of goat semen. *Indian Journal of Animal Science*, 90(4), pp. 560-563. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJAnS/article/view/104197>
- Silva, E.C.B., Lima, R.A. and Guerra, M.M.P., 2021. Goat semen freezing: the two faces of the coin. *Animal Science*, 31(1), pp. 134-144. [http://www.uece.br/cienciaanimal/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=797&tmpl=component&format=raw&Itemid=157](http://www.uece.br/cienciaanimal/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=797&tmpl=component&format=raw&Itemid=157)
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J. and Zhang, D., 2020. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-ased extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, pp. 146-150. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.12.004.
- Tabarez, A., García, W. and Palomo, M.J., 2017. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 149, pp. 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.007>
- Tekin, K. and Daskin, A., 2016. Effect of different extenders on motility and some sperm kinematics parameters in Norduz goat semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, pp. 1-6. doi:10.3906/vet-1509-5
- Tibary, A. and Manar, S., 2018. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(2), pp. 195-210. [https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes\\_IAPH2/article/view/600](https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/view/600)
- Ugur, M.R., Abdelrahman, A.S., Evans, H.C., Gilmore, A.A., Hitit, M., Arifiantini, R.I., Purwantara, B., Kaya, A. and Memili, E., 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, pp. 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Vidal, A.H., Batista, A.M., da Silva, E.C.B., Gomes, W.A., Pelinca, M.A., Silva, S.V. and Guerra, M.M.P., 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 109, pp. 47-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022>
- Wahjuningsih, S., Ciptadi, G. and Pridiawati, K., 2019. The effect of water clover (*Marsilea crenata*) extract addition in egg yolk and skim milk extender on frozen goat semen quality. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*; Bristol Tomo 387, N° 1. doi:10.1088/1755-1315/387/1/012103
- Watson, P.F., 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low-density lipoprotein

- fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*, 1, pp. 135-141. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(76\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0306-4565(76)90003-6)
- Yimer, N., Noraisyah, A.H., Rosnina, Y., Wahid, H., Sarsaifi, K. and Hafizal, A.M., 2014. Comparison of cryopreservative effect of different levels of omega-3 egg-yolk in citrate extender on the quality of goat spermatozoa. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(3), pp. 347-350. [www.pvj.com.pk](http://www.pvj.com.pk)
- Yodmingkwan, P., Guntaprom, S., Jaksamrit, J. and Lertchunhakiat, K., 2016. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 11, pp. 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>
- Zakiya, N.A.H., Yanti, A.H. and Setyawati, T.R., 2020. Viability of Peranakan Etawah liquid semen preserved in tris substituted with various energy sources. *The Indian Journal of Veterinary Sciences*, 25(2), pp. 68-73. <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v25i2.2026>
- Zamiri, M.J., 2020. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8(1), pp. 1-15. doi:10.22103/jlst.2020.15927.1321.