

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN ENTRE LA CONGELACIÓN CLÁSICA Y LA  
VITRIFICACIÓN CINÉTICA DE SEMEN DE CHIVOS DURANTE LA  
ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

**por**

**Nicolas CANTERAS**

TESIS DE GRADO presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2019**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dra. Rosa García

Segundo miembro (Tutor):

---

Dra. María Noel Viera

Tercer miembro:

---

Dr. Marcelo Rodríguez P.

Cuarto miembro (Cotutor) :

---

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha:

---

29/10/2019

Autor:

---

Nicolás Canteras

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, principalmente a mi madre y al Tato por su apoyo constante, también a Gonzalo y Lucia por darme una mano cuando la necesite.

A mi tutora María Noel Viera y a mi co-tutor Rodolfo Ungerfeld por orientarme y permitirme cerrar esta etapa.

A Patricia Silveira por su apoyo y colaboración en el trabajo, a Milton Pintos por su labor en el manejo y cuidado de los animales.

A Carlos Machado, Victoria Urioste, Felipe Aristegui y Antonela Geymonat por orientarme en el comienzo de la actividad, a Florencia Beracochea y Matías Villagrán por su apoyo y buena disposición.

A los compañeros que colaboraron en el trabajo, especialmente María Jesús Frisch, Lucia Fazzio, Víctor Mayorca y Augusto Ryonosuke.

A los amigos y compañeros que me he encontrado a lo largo de la carrera.

A la cátedra de fisiología por permitirme el uso del laboratorio y su entorno.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDOS.....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Criopreservación espermática.....	11
1.2 Técnicas de criopreservación.....	12
1.2.1 Congelación clásica.....	12
1.2.2 Vitricación cinética.....	12
1.3 Diluyentes para la criopreservación.....	13
1.3.1 Funciones y componentes básicos de un diluyente.....	13
1.3.2 Agentes crioprotectores (ACP).....	14
1.4 Estacionalidad reproductiva.....	14
1.4.1 Fotoperiodo.....	15
1.4.2 Endocrinología reproductiva en el macho.....	15
1.4.3 Características de los caprinos y su estacionalidad reproductiva.....	16
1.5 Dificultades y búsquedas de alternativas a la congelación clásica.....	17
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVO.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
A. Evaluación del semen fresco.....	19

B. Purificación de semen fresco y su evaluación.....	19
C. Adición de diluyente y congelación/vitrificación.....	20
D. Descongelación /desvitrificación y su evaluación.....	20
E. Purificación de las muestras una vez descongeladas/desvitrificadas y su evaluación.....	21
F. Análisis estadísticos.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Espermatozoides motiles.....	22
5.2 Espermatozoides con motilidad progresiva.....	23
5.3 Calidad de la motilidad.....	25
5.4 Espermatozoides vivos.....	27
5.5 Espermatozoides normales.....	28
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIÓN.....	32
8. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<u>Tabla 1.</u> Efectos en los parámetros seminales, de la técnica, el tiempo, las etapas y sus interacciones.....	22
<u>Figura 1.</u> Porcentaje de espermatozoides motiles a lo largo de los días de colección seminal.....	23
<u>Figura 2.</u> Porcentaje de espermatozoides motiles a lo largo de las etapas de procesamiento.....	23
<u>Figura 3.</u> Porcentaje de espermatozoides motiles progresivos a lo largo de los días de colección seminal.....	24
<u>Figura 4.</u> Porcentaje de espermatozoides motiles progresivos a lo largo de las etapas de procesamiento.....	25
<u>Figura 5.</u> Calidad de la motilidad espermática a lo largo de los días de colección seminal.....	26
<u>Figura 6.</u> Calidad de la motilidad espermática a lo largo de las etapas de procesamiento.....	26
<u>Figura 7.</u> Porcentaje de vitalidad espermática a lo largo de los días de colección seminal.....	27
<u>Figura 8.</u> Porcentaje de vitalidad espermática a lo largo de las etapas de procesamiento.....	27
<u>Figura 9.</u> Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales a lo largo de los días de colección seminal.....	28

## RESUMEN

La baja fertilidad obtenida en pequeños rumiantes con material espermático congelado y descongelado determina la necesidad de buscar alternativas en la criobiología espermática. El objetivo del presente trabajo fue comparar la eficiencia de la técnica de vitrificación cinética frente a la congelación clásica para la criopreservación de semen de chivos de Gabón, durante su estación reproductiva. El trabajo se realizó con un grupo de 10 chivos, colectando el semen de febrero a abril, en forma quincenal mediante electroeyaculación. Una vez obtenida la muestra seminal, se evaluó el porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, la calidad de la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Posteriormente, se purificó la muestra seminal mediante una columna de gradiente de densidad y su centrifugación, una vez eliminado el sobrenadante, se realizó la evaluación de los mismos parámetros que en la etapa anterior (excepto para el porcentaje de espermatozoides vivos). La muestra seminal purificada, fue dividida en dos alícuotas, a una se le adicionó diluyente de congelación y a la otra diluyente de vitrificación. Luego se realizó una curva de enfriado, la muestra con diluyente de vitrificación se mantuvo a 5 °C durante 30 min, se evaluaron los parámetros espermáticos, para posteriormente ser almacenada en forma de pellets dentro de criotubos. En cambio a la muestra con diluyente de congelación clásica se la mantuvo durante 3hs a 5°C, se evaluaron los parámetros espermáticos, para luego ser almacenada en pajuelas. Las muestras criopreservadas fueron descongeladas y desvitrificadas, para luego ser evaluados los parámetros antes mencionados. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento de purificación que en las muestras frescas y se evaluaron los mismos parámetros. El análisis estadístico se realizó con el software SAS versión 9 (Statistical Analysis Software, 2002, Visual Statistics, Carolina del Norte, EEUU) utilizándose un modelo mixto. En el análisis se consideraron como factores principales las técnicas (congelación clásica vs vitrificación cinética) el tiempo (fechas de colección seminal) y las etapas (semen fresco: 0; semen purificado: 1; semen con diluyente: 2; semen descongelado/ desvitrificado: 3 y semen purificado una vez descongelado/desvitrificado: 4). Además se consideraron las respectivas interacciones entre los distintos factores. Dentro de los resultados obtenidos, el porcentaje de espermatozoides motiles, fue mayor con la técnica de congelación clásica que con la vitrificación cinética ( $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides motiles a lo largo de los días de colección ( $P = 0,05$ ) y de las diferentes etapas de procesamiento ( $P < 0,0001$ ). No se presentó interacción entre la técnica y los días de colección seminal, pero si hubo interacción entre la técnica y la etapa ( $P < 0,0001$ ). Además se encontró interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa ( $P = 0,03$ ). El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, fue mayor mediante la técnica de congelación clásica en

comparación a la vitrificación cinética ( $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a lo largo de los días de colección ( $P = 0,007$ ) y de las diferentes etapas ( $P < 0,0001$ ). No hubo interacción entre la técnica y los días de colección seminal, pero si hubo interacción entre la técnica y la etapa ( $P < 0,0001$ ). Además, se encontró interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa ( $P = 0,002$ ). La calidad de la motilidad, fue mayor mediante la técnica de congelación clásica, en comparación a la vitrificación cinética ( $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en la calidad de la motilidad espermática a lo largo de los días de colección ( $P < 0,0001$ ) y de las diferentes etapas ( $P < 0,0001$ ). Además, se encontró interacción entre la técnica y los días de colección seminal ( $P = 0,01$ ) y entre la técnica y la etapa de procesamiento ( $P < 0,0001$ ). Así como también, interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa ( $P = 0,0006$ ). El porcentaje de espermatozoides vivos, no presentó diferencias significativas a favor de ninguna de las dos técnicas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas a lo largo de los días de colección ( $P = 0,0005$ ) y de las etapas de procesamiento ( $P < 0,0001$ ). Además hubo interacción entre la técnica y los días de colección seminal ( $P = 0,01$ ) e interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa ( $P < 0,0001$ ) pero no se encontró interacción entre la técnica y la etapa. El porcentaje de espermatozoides normales, no presentó diferencias significativas a favor de ninguna de las técnicas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas a lo largo de los días de colección ( $P < 0,0001$ ) aunque no a lo largo de las etapas de procesamiento. No se presentó interacción entre la técnica y los días de colección seminal, así como tampoco entre la técnica y la etapa. Tampoco se encontró interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa. Se concluyó, que mediante la congelación clásica se obtuvieron mejores resultados de criopreservación seminal que con la vitrificación cinética durante la estación reproductiva de los chivos de Gabón.

## SUMMARY

The low fertility obtained in small ruminants with frozen and thawed sperm material determines the need to look for alternatives in sperm cryobiology. The objective of this work was to compare the efficiency of the technique of kinetic vitrification against classical freezing for the cryopreservation of sperm from Gabon goats during their reproductive season. The work was carried out with a group of 10 goats, by collecting the semen biweekly through electroejaculation. Once the seminal sample was obtained, the quality of sperm motility, the percentage of motile and sperm with progressive motility, the percentage of normal sperm and the percentage of live sperm were evaluated. Subsequently, the seminal sample was purified by a density gradient column and its centrifugation, once the supernatant was removed, the evaluation of the same parameters as in the previous stage was performed (except for the percentage of live sperm). The purified seminal sample was divided into two aliquots, one was added freezing diluent and the other vitrification diluent. Then a cooling curve was performed, for the sample with the vitrification diluent being kept at 5 ° C for 30 min, to be later stored in the form of pellets inside cryotubes. In contrast to the sample with the classic freezing diluent, it was kept for 3 hours at 5 ° C, and then stored in straws. The cryopreserved samples were thawed and devitrified, and then the sperm parameters were evaluated. Subsequently, the same purification procedure was performed as in the fresh samples and the same parameters were evaluated. Statistical analysis was performed with SAS software (Statistical Analysis Software, Visual Statistics, North Carolina, USA) using a mixed model. In the analysis the techniques (classical freezing vs. kinetic vitrification) were considered as main factors the time (seminal collection dates) and the stages (fresh semen: 0; purified semen: 1; semen with diluent: 2; defrosted / devitrified semen: 3 and purified semen once thawed / devitrified: 4). In addition, the respective interactions between the different factors were considered. Among the results obtained, the percentage of motile sperm was higher with the classical freezing technique than with the kinetic vitrification ( $P < 0.0001$ ). Significant differences were found in the percentage of motile sperm throughout the days of collection ( $P = 0.05$ ) and the different processing stages ( $P < 0.0001$ ). There was no interaction between the technique and the days of seminal collection, but there was interaction between the technique and the stage ( $P < 0.0001$ ). In addition, interaction was found between technique, time and stage ( $P = 0.03$ ). The percentage of sperm with progressive motility was higher using the classical freezing technique compared to kinetic vitrification ( $P < 0.0001$ ). Significant differences were found in the percentage of sperm with progressive motility throughout the days of collection ( $P = 0.007$ ) and the different stages ( $P < 0.0001$ ). There was no interaction between the technique

and the days of seminal collection, but there was interaction between the technique and the stage ( $P < 0.0001$ ). In addition, interaction was found between technique, time and stage ( $P = 0.002$ ). The quality of the motility, was greater by means of the technique of classic freezing, in comparison to the kinetic vitrification ( $P < 0.0001$ ). Significant differences were found in the quality of sperm motility throughout the days of collection ( $P < 0.0001$ ) and the different stages ( $P < 0.0001$ ). In addition, interaction was found between the technique and the days of seminal collection ( $P = 0.01$ ) and between the technique and the processing stage ( $P < 0.0001$ ). As well as interaction between technique, time and stage ( $P = 0.0006$ ). The percentage of live sperm, showed no significant differences in favor of either technique. However, if significant differences were found throughout the days of collection ( $P = 0.0005$ ) and processing stages ( $P < 0.0001$ ). In addition there was interaction between the technique and the days of seminal collection ( $P = 0.01$ ) and interaction between the technique, the time and the stage ( $P < 0.0001$ ) but no interaction was found between the technique and the stage. The percentage of normal sperm did not show significant differences in favor of any of the techniques. However, if significant differences were found throughout the days of collection ( $P < 0.0001$ ) although not throughout the processing stages. There was no interaction between the technique and the days of seminal collection, as well as between the technique and the stage. Nor was interaction found between technique, time and stage. It was concluded that classical freezing generated better results of seminal cryopreservation than kinetic vitrification during the reproductive season of the Gabon goats.

## 1. Introducción

### 1.1 Criopreservación espermática

La reacción de los “animálculos” (espermatozoides) de distintas muestras de semen cuando se los expuso a bajas temperaturas, la describió por primera vez Spallanzani en 1776. Sin embargo, la congelación del esperma tal como se conoce hoy tomó importancia a partir de la década de 1950, cuando el proceso de congelación espermática se mejoró de manera considerable, lo que ha permitido la conservación de espermatozoides de una gran variedad de especies (Sztein y col., 2018).

La criopreservación celular se define como una herramienta biotecnológica mediante la que se puede conservar la viabilidad y funcionalidad de las células a bajas temperaturas (Ávila Portillo y col., 2006). El metabolismo de las células disminuye dramáticamente a bajas temperaturas, lo que permite prolongar la vida celular y por lo tanto lograr su preservación (Gao y Critser, 2000).

La criopreservación espermática exitosa ofrece ventajas como el almacenamiento espermático a largo plazo, facilita su transporte a distancia, mejora su control sanitario y así se favorece el uso de material genéticamente superior, incluso después de la muerte del animal. Estas ventajas de la criopreservación espermática a su vez potencian las ventajas que ofrece la inseminación artificial (Bailey y col., 2000). Se facilita y acelera la mejora genética de características productivas y reproductivas en animales de interés productivo (Leboeuf y col., 2000) reduciendo riesgos de transmisión de enfermedades infecciosas. La utilización de material seminal criopreservado ofrece beneficios en la cría de animales de producción, pero también contribuye a la conservación de especies en peligro de extinción y es de gran importancia en la medicina reproductiva humana (Watson, 2000).

Sin embargo, la fertilidad alcanzada con la utilización de material seminal criopreservado es menor que con el semen fresco (Watson, 2000). Esto es consecuencia de la reducción de la viabilidad espermática como de la disfuncionalidad dentro de la población espermática sobreviviente. Las causas son una serie de factores potencialmente dañinos como el shock por frío, shock osmótico, daños tóxicos, oxidativos y formación de cristales de hielo (Watson, 2000).

La criopreservación de espermatozoides es un proceso complejo que implica el equilibrio de muchos factores, debiéndose aplicar un protocolo adecuado que ampare las características seminales de la especie con que se esté trabajando, ya que los espermatozoides de las diferentes especies

responden diferente a las tensiones generadas durante la criopreservación (Purdy, 2006).

## 1.2 Técnicas de criopreservación

Dentro de las técnicas de criopreservación de semen están la congelación clásica y la vitrificación cinética.

### 1.2.1 Congelación clásica

La congelación clásica es una técnica de criopreservación espermática ampliamente utilizada, siendo el método de referencia frente al que se valida cualquier nueva técnica, como la vitrificación cinética. Para llevar a cabo la congelación clásica, se debe adicionar un diluyente a la muestra espermática de forma de suministrarle nutrientes y protección frente a factores potencialmente dañinos. Además, se somete a estos espermatozoides a un enfriamiento lento y progresivo, de forma de evitar el daño por shock de frío. En el diluyente empleado para la congelación seminal se encuentra el crioprotector, el que se usa para desplazar o extraer el agua del citoplasma celular evitando que durante la congelación se formen cristales de hielo intracelulares. El descubrimiento del glicerol como crioprotector marcó un avance notable en la criopreservación seminal por congelación, posicionándolo como método de referencia, siendo más exitoso en el semen de toro con resultados variables para el de otros mamíferos (Holt, 2000).

### 1.2.2 Vitrificación cinética

Por otro lado la vitrificación se basa en la congelación rápida de una solución con alta concentración de crioprotectores, la que a bajas temperaturas aumenta la viscosidad formando un sólido amorfo, sin la formación de cristales de hielo. En este estado de sólido amorfo, el agua se solidifica pero no se expande, lo que sucede gracias a un rápido enfriamiento, conduciéndose así a un aumento extremo en la viscosidad sin cristalización intracelular (Ávila Portillo y col., 2006).

La vitrificación exitosa depende de tres factores: la velocidad de enfriamiento y calentamiento, la viscosidad y el volumen de la muestra (Arav y col., 2002). Al sumergir la muestra en nitrógeno líquido, la velocidad de enfriamiento puede llegar a cientos de miles de °C/min, dependiendo del volumen, la conductividad térmica y la composición de la solución. La velocidad de enfriamiento es tan importante como la velocidad de calentamiento al momento de desvitrificar, ya que debe evitarse la nucleación de hielo o el crecimiento de cristales de hielo que son dañinos para la célula (Gao y Critser, 2000). La concentración y las acciones del crioprotector definen la viscosidad del medio y la capacidad de transición vítrea de la solución a bajas temperaturas, reduciendo la probabilidad de nucleación de hielo y

cristalización. En cuanto al volumen de la muestra, cuanto menor sea, mayor probabilidad de vitrificación: volúmenes pequeños permiten una mejor transferencia de calor y facilitan mayores velocidades de enfriamiento (Arav, 2014). La probabilidad de lograr una vitrificación exitosa, mejora al disminuir el volumen de la solución, aumentar su velocidad de enfriamiento, o aumentar su viscosidad, aunque este último punto se busca lograrlo con una concentración moderada de crioprotectores, para minimizar sus efectos tóxicos y osmóticos peligrosos (Arav, 2014; Arav y col., 2002).

### 1.3 Diluyentes para la criopreservación

El diluyente se refiere a una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado y su fraccionamiento en varias dosis, mantiene la viabilidad de los espermatozoides criopreservados, sus características funcionales y por lo tanto su fertilidad (Trejo y col., 2013).

#### 1.3.1 Funciones y componentes básicos de un diluyente

Los espermatozoides obtienen su energía principalmente por vía glicolítica y procesos que están vinculados a las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. Para cumplir su función, el diluyente debe aportar una fuente que genere esa energía, y lo más frecuente es la utilización de monosacáridos como glucosa o fructosa (Aisen, 2004; Gadea, 2003). El metabolismo espermático genera metabolitos como el ácido láctico que hace que el pH baje perjudicando a la célula, por lo que el diluyente para conservar el pH óptimo debe aportar agentes buffer simples, como bicarbonato, citrato de sodio, o más complejos como hidroximetil aminometano (Tris) o N-Tris (hidroximetil) metil 2-ácido sulfónico aminometano (Tes) (Quan y col., 2016; Sánchez y col., 2006; Sánchez y Tsutsui, 2002). Para mantener el equilibrio electrolítico y la presión osmótica pueden utilizarse en el diluyente sales de iones inorgánicos como cloruro sódico y potásico (Gadea, 2003). Por otra parte, la utilización del agua destilada que actúa como solvente en el diluyente, contribuye en el aumento del volumen de toda la solución. El diluyente debe aportar antibióticos como penicilina o estreptomina para controlar la contaminación microbiana, que puede darse desde el momento de la colección seminal (Aisen, 2004). Además, el diluyente debe dar protección frente a los efectos dañinos causados por los cambios térmicos, lo que se puede lograr con materiales orgánicos como la yema de huevo o la leche. La yema de huevo tiene una fracción lipoproteica de baja densidad que se adhiere a las membranas celulares y las protege, en cambio la leche provee protección a través de la lactosa y la caseína (Aisen, 2004; Builtrago y Pérez, 2008). La lactenina de la leche es espermicida por lo que debe usarse leche descremada en polvo o leche descremada ultra pasteurizada (UHT) (Saporiti y Catalano, 2005). Otros de los componentes en los diluyentes son los agentes crioprotectores (ACP).

### 1.3.2 Agentes crioprotectores (ACP)

Los agentes crioprotectores son sustancias que pueden minimizar las tensiones físico-químicas resultantes del enfriamiento, congelación y descongelación de los espermatozoides (Purdy, 2006). Pueden clasificarse bioquímicamente en 3 grupos: alcoholes (metanol, etanol, glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa) y dimetilsulfoxido. Además pueden clasificarse como ACP penetrantes (glicerol, dimetilsulfoxido) y no penetrantes (glucosa, dextrosa, sucrosa). Los ACP penetrantes son de bajos pesos moleculares y permeables a través de la membrana celular, reemplazan el agua intracelular y evitan daños por la formación de cristales de hielo. Los ACP no penetrantes son de alto peso molecular y no permeables a través de la membrana celular, promueven una rápida deshidratación de la célula por lo que son efectivos a altas velocidades de congelación (Ávila Portillo y col., 2006). Los ACP son componentes osmóticamente activos, con la capacidad de generar movimientos de agua a través de las membranas semipermeables. Debido al agua conducida osmóticamente, la concentración de las soluciones a los lados de la membrana se equilibra, por lo que luego de un tiempo determinado es posible lograr una deshidratación intracelular. De esta manera, menos agua en el espermatozoide disminuye su punto de congelación y produce menos cristales de hielo evitando daños y manteniendo la fertilidad (Purdy, 2006).

### 1.4 Estacionalidad reproductiva

Los hábitats donde viven los mamíferos, a menudo presentan desafíos energéticos y nutricionales que varían estacionalmente, como en el caso de las regiones templadas, de manera que muchos animales adoptan estrategias de reproducción estacional (Bronson, 1985). Por ello paren en el momento óptimo del año, permitiendo que los recién nacidos crezcan bajo condiciones favorables de temperatura y disponibilidad de alimentos (Thiéry y col., 2002). La época del año en la que estos animales son reproductivamente activos varía de una especie a la otra, dependiendo principalmente de la duración de su gestación (Malpoux, 2006).

Las señales ambientales de mayor importancia para la reproducción estacional de los mamíferos son la disponibilidad de alimentos, la temperatura ambiente, la lluvia y el ciclo día/noche (Bronson, 1985). La integración neuronal de estas señales ambientales converge en neuronas hipotalámicas para regular la fisiología reproductiva (Stevenson y Ball, 2011), siendo el fotoperiodo la señal ambiental principal en el control de la reproducción estacional (Malpoux, 2006).

#### 1.4.1 Fotoperiodo

El fotoperiodo, es el tiempo diario de exposición a la luz que los organismos usan como señal ambiental, la que es anticipatoria de eventos estacionales (Bradshaw y Holzapfel, 2007). De las diferentes señales estacionales, el cambio anual en la duración del día es altamente predecible. Proporciona la señal más confiable utilizada para indicar la época del año y sincronizar los ritmos anuales endógenos de la reproducción (Thiéry y col., 2002). Las señales de luz activan fotoreceptores retinianos, transmitiéndose al hipotálamo, que luego se propagan a la glándula pineal donde se secreta melatonina, transformando un mensaje neuronal a una señal hormonal (Karsch y col., 1984). La melatonina se secreta durante la noche, proporcionando así información al organismo sobre la duración del día (Thiéry y col., 2002), lo que se interpreta como inductivo o supresivo, dependiendo de la especie. En el caso de los pequeños rumiantes como los caprinos, el acortamiento del día, principalmente durante los meses de otoño, es una señal que induce la actividad reproductiva (Karsch y col., 1984). Además, la melatonina desencadena variaciones en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y esta actúa sobre las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), responsables de la actividad gonadal (Thiéry y col., 2002).

#### 1.4.2 Endocrinología reproductiva en el macho

La modulación reproductiva en los machos de especies con reproducción estacional se da en términos cuantitativos, ya que la producción diaria de espermatozoides no se suprime pero es menor fuera de la estación reproductiva (Thiéry y col., 2002). La función testicular está regulada por el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal: a nivel hipotalámico se secreta la GnRH, liberada de forma pulsátil y transportada en sangre por el sistema porta hacia la adenohipofisis. Se estimula así la secreción de la LH y FSH, las que se dirigirán posteriormente al testículo (Clarke y col., 1983; Martin y col., 1990).

En el testículo la FSH se une a receptores en las células de Sertoli, estimulando su función reguladora de la espermatogénesis. Las células de Sertoli están ubicadas en los túbulos seminíferos, tienen un citoplasma extendido en el epitelio germinativo de dichos túbulos, por lo que son componentes importantes en su estructura. Además nutren a las células germinales que están en estrecho contacto con su membrana plasmática, mientras avanzan en los distintos estadios de desarrollo espermatogénico. Otras funciones de las células de Sertoli son la síntesis de la proteína ligadora de andrógenos (ABP), la que permite el transporte de andrógenos producidos en el intersticio hacia el epitelio germinal de los túbulos seminíferos. Además secretan inhibina, una hormona que actúa directamente sobre la hipófisis,

donde junto a la testosterona ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH (Martin y col., 1990; Tilbrook y Clarke, 2001).

La LH se une a los receptores de las células de Leydig o intersticiales, estimulando su función. Estas células se localizan en el estroma del tejido conectivo del testículo, entre los túbulos seminíferos y son las principales responsables de la producción de andrógenos, siendo el de mayor importancia la testosterona. La secreción de LH está regulada por retroalimentación negativa de esteroides testiculares, como la testosterona, que actúan dentro del sistema nervioso central para suprimir la secreción de GnRH (Martin y col., 1990; Tilbrook y Clarke, 2001). La testosterona es una hormona sintetizada a partir del colesterol, pertenece a la clase de esteroides llamados andrógenos. Es importante para el desarrollo de las características sexuales masculinas luego de la pubertad, estimula el aumento muscular, retrasa el cierre epifisario, estimula el desarrollo de la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides, estimula también la actividad secretoria de los órganos accesorios del macho, así como el desarrollo y mantenimiento de la libido (Dyce y col., 1996; Stocco y Mc Phaul, 2006).

#### 1.4.3 Características de los caprinos y su estacionalidad reproductiva

La especie caprina, particularmente la raza enana de Gabón, presenta individuos dóciles y de fácil manejo. Esta especie tiene una reproducción de tipo estacional ya que atraviesan un periodo en el año donde los machos intensifican su actividad reproductiva y las hembras presentan ciclos estrales, periodo denominado estación reproductiva (Karsch y col., 1984; Thiéry y col., 2002). Los chivos de raza Gabón, presentan un patrón reproductivo estacional leve o poco marcado en Uruguay, con mejores características reproductivas desde el mes de noviembre hasta el mes de abril (desde final de primavera hasta mediados de otoño) (Giriboni, 2017). Es importante tener en cuenta, que caprinos como los chivos de raza Gabón, producen un plasma seminal que genera interacciones perjudiciales con los diluyentes que contienen yema de huevo. Esto se da por la presencia de una enzima fosfolipasa, de origen bulbouretral que hidroliza la lecitina de la yema de huevo, generando toxicidad a los espermatozoides (Purdy, 2006). La concentración de la enzima, parece estar sujeta a variaciones estacionales, con actividades más elevadas durante la temporada reproductiva (Iritani y Nishikawa, 1962). Para superar dichas interacciones perjudiciales, se puede diluir la muestra en un diluyente buffer y luego separar el plasma seminal mediante centrifugación (Ritar y Salamon, 1982). A su vez, la yema de huevo utilizada en el diluyente, puede ser inactivada colocándola en una estufa a 65 °C durante 5 min.

### 1.5 Dificultades y búsquedas de alternativas a la congelación clásica

La congelación puede preservar una célula durante tiempo indeterminado, pero paradójicamente, también puede causar su destrucción (Mazur, 1984). Durante los procesos de congelación y descongelación, el shock por frío, el shock osmótico, y los radicales oxidativos pueden causar lesiones en las membranas celulares, en sus receptores y en el ADN, lo que afecta la viabilidad y la funcionalidad espermática (Watson, 2002), perjudicando finalmente la fertilidad.

La baja fertilidad obtenida en pequeños rumiantes con material espermático congelado y descongelado determina la necesidad de buscar alternativas en la criobiología espermática (Santiago Moreno, 2014). De ahí el interés por realizar estudios comparativos, para encontrar alternativas como podría ser la vitrificación cinética frente a la congelación clásica en la conservación seminal.

## **2. Hipótesis**

La técnica de vitrificación cinética es una alternativa a la congelación clásica para la criopreservación de semen de chivo de Gabón durante la estación reproductiva.

## **3. Objetivo**

Comparar la eficiencia de la técnica de vitrificación cinética con la congelación clásica para la criopreservación de semen de chivos de Gabón durante la estación reproductiva.

#### **4. Materiales y métodos**

El trabajo se realizó con un grupo de 10 chivos de la raza de Gabón, los que permanecieron en instalaciones del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). El trabajo se realizó durante su estación reproductiva, de febrero a abril, colectando semen en forma quincenal. Para la colección seminal se utilizó un electroeyaculador (Fuhijira Industry Tokyo, Japón) equipado con un vástago de 30 x 1,5 cm, con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho. La estimulación eléctrica consistió en 10 pulsos de 3 – 5 s de duración para cada voltaje, comenzando en 1 V y aumentando en forma gradual hasta un máximo de 6 V.

##### ***A. Evaluación de semen fresco***

Una vez obtenida la muestra seminal, se la evaluó, utilizando un microscopio óptico de contraste de fase (Nikon, modelo eclipse E 200, Shanghai, China) equipado con una platina térmica a 37 °C. En dicha evaluación se determinó: el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la calidad de la motilidad espermática utilizando una escala de 0 a 5, donde 0 es ausencia de movimiento y 5 cuando el movimiento es muy rápido (Fernández y col., 2013). Para la evaluación de los tres parámetros antes mencionados se realizó una dilución de la muestra seminal fresca con leche descremada UHT, evaluándose con microscopio óptico, a un aumento de 40x. Además, se determinó el volumen total del eyaculado. Durante toda esta etapa la muestra seminal fresca se mantuvo a 37 °C, en una cuba a baño maría.

También se realizó la tinción en eosina/nigrosina para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos, y se fijaron muestras en formol citrato para determinar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, con microscopio óptico (aumento 40x).

##### ***B. Purificación de semen fresco y su evaluación***

La composición de las soluciones Bottom y Top fue realizada con, Bovipure y Bovidilute (Nidacon, Mölndal, Suecia) en proporciones diferentes, para el Bottom, 8 mL de Bovipure y 2 mL de Bovidilute, en cambio para el Top, 4 ml de Bovipure y 6 mL de Bovidilute. Se calculó la concentración de espermatozoides de la muestra de semen fresca utilizando una cámara de Neubauer. Posteriormente, esta concentración junto al valor del volumen total de la muestra permitió determinar el volumen de las soluciones de Botton y de Top a utilizar para formar la columna de gradiente de densidad y poder purificar la muestra.

Para formar la columna de gradiente de densidad, se colocó primero en un tubo falcon el volumen calculado de Bottom y luego el volumen calculado de

Top, agregado suavemente por las paredes del tubo para no mezclar las soluciones. Finalmente se colocó la totalidad de la muestra seminal fresca, también con precaución de no romper la columna formada. Luego de centrifugarse a 300G durante 20 min se obtuvo el semen purificado.

Una vez eliminado el sobrenadante y obtenido el semen purificado se evaluó: el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, la calidad de la motilidad, y se fijó dicha muestra en formol para posteriormente determinar el porcentaje de espermatozoides normales. Para evaluar los parámetros antes mencionados, se procedió de la misma manera que en la etapa anterior. También se determinó el volumen y se calculó la concentración de la muestra seminal purificada para determinar el volumen de cada diluyente (de congelación y de vitrificación) a utilizar.

### *C. Adición de diluyente y congelación/vitrificación*

La muestra seminal purificada fue dividida en dos alícuotas, a una de ellas se le adicionó diluyente de congelación: TCG (Tris, Ácido Cítrico, Glucosa), 6% yema de huevo inactivada y 5% glicerol, a la otra, diluyente de vitrificación: TCG, 6% yema de huevo inactivada y 100 mM sucrosa. La adición fue en los volúmenes calculados anteriormente, de modo de obtener una concentración de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Se colocó el tubo con la muestra seminal diluida para congelar en un vaso de bohemia con agua a temperatura ambiente, comenzando así una curva de enfriamiento lento. Luego se la colocó en la heladera y una vez alcanzada la temperatura de 5 °C se equilibró por 3 h (la concentración de las soluciones a los lados de la membrana celular se equilibró, lo que permitió la deshidratación intracelular). Con las muestras diluidas para vitrificar se cumplió el mismo proceso, con la diferencia de que el periodo de equilibrado en la heladera fue de 30 min a 5 °C. Posteriormente se evaluó el porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides normales. Luego, las muestras con diluyente para congelar fueron colocadas en pajuelas de 0,25 mL, las que fueron ubicadas en vapores de nitrógeno líquido (-80°C) durante 10 min y posteriormente se las introdujo directamente en nitrógeno líquido (-196°C). Sin embargo, las muestras con diluyente de vitrificación, luego del equilibrado de 30 min, se dejaron caer en gotas de 50 µL directamente al nitrógeno líquido formándose pellets. Luego los pellets fueron envasados en criotubos y almacenados a -196 °C.

### *D. Descongelación/desvitrificación y su evaluación*

Las muestras criopreservadas fueron descongeladas y desvitrificadas. Para la descongelación, las pajuelas pasaron del nitrógeno líquido (-196 °C) a

temperatura ambiente durante 10 s y luego a un baño maría de 37 °C durante 30 s. Posteriormente se cortaron ambos extremos de la pajuela y se transfirió su contenido a un recipiente limpio. Para la desvitrificación, se utilizó un equipo desvitrificador específico (DDP70, INIA, España) el que se ajustó a una temperatura de entre 65-70°C. Los pellets se sacaron del nitrógeno líquido para ubicarlos en el DDP70 (cumpliendo con una velocidad ultrarrápida de calentamiento) y cuando estos se fluidificaron fueron recogidos en un recipiente limpio. Posteriormente se analizó el porcentaje de espermatozoides motiles, de espermatozoides con motilidad progresiva, la calidad de la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, de espermatozoides normales y se determinó el volumen de la muestra.

Se utilizó un equipo de análisis ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático, ISAS V1, PROISER, Valencia, España) para determinar con precisión la motilidad espermática.

#### *E. Purificación de las muestras una vez descongeladas/desvitrificadas y su evaluación*

Una vez que se contó con los datos del volumen y la concentración de las muestras seminales ya descongeladas/desvitrificadas, se determinó el volumen de las soluciones de Bottom y de Top a utilizar. De esta manera, se realizó el mismo procedimiento de purificación que para las muestras frescas pre diluidas. Posteriormente con el material purificado se evaluó el porcentaje de espermatozoides motiles, de espermatozoides con motilidad progresiva, la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y de espermatozoides normales.

#### *F. Análisis estadísticos*

El análisis estadístico se realizó con el software SAS (Statistical Analysis Software, Visual Statistics, Carolina del Norte, EEUU) utilizándose un modelo mixto. En el análisis se consideraron como factores principales las técnicas (congelación clásica vs vitrificación cinética), el tiempo (fechas de colección seminal) y las etapas (semen fresco: 0; semen purificado: 1; semen con diluyente: 2; semen descongelado /desvitrificado: 3 y semen purificado una vez descongelado/desvitrificado: 4). Además se consideraron las respectivas interacciones entre los distintos factores.

## 5. Resultados

Los efectos principales para cada uno de los parámetros seminales analizados se presentan en la Tabla 1. Todos los parámetros seminales variaron de acuerdo a los días de colección y a las distintas etapas (excepto el porcentaje de espermatozoides normales). Además, se observó interacción entre las técnicas de criopreservación y los días de colección, en la calidad de la motilidad y en el porcentaje de espermatozoides vivos. Se observó interacción entre las técnicas y las etapas en el porcentaje de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva y calidad de la motilidad. También se observó, interacción entre las técnicas, el tiempo y las etapas, en todos los parámetros (excepto en el porcentaje de espermatozoides normales).

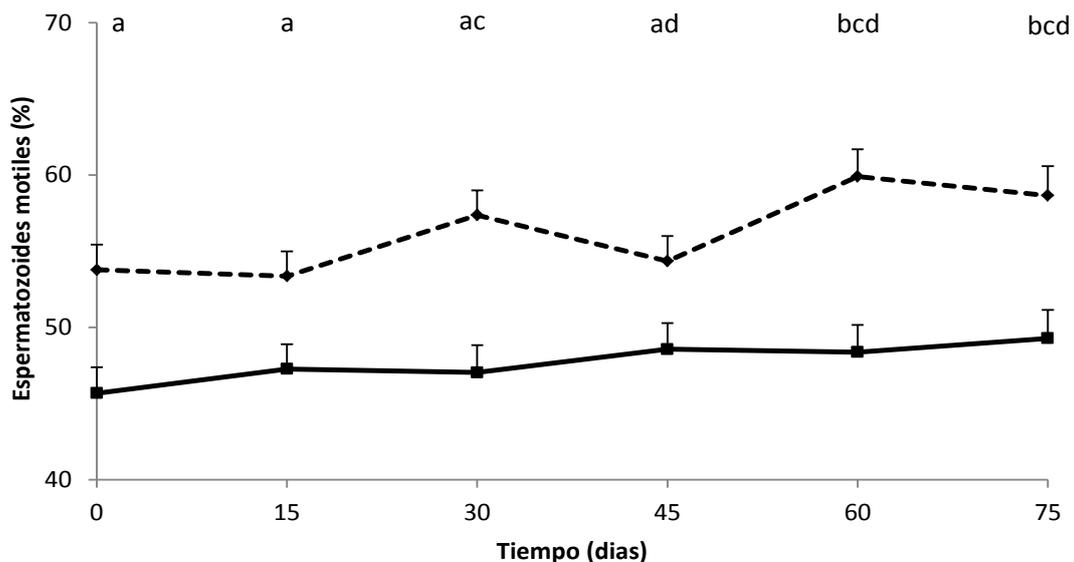
**Tabla 1:** Efectos principales de la técnica de criopreservación (Tc), tiempo (ti) y etapas (et) así como sus respectivas interacciones sobre el porcentaje de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva, calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides normales en chivos.

Parámetros seminales	Tc	ti	Et	Tc * ti	Tc * et	Tc * ti * et
Espermatozoides motiles (%)	<0,0001	0,05	<0,0001	ns	<0,0001	0,03
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	<0,0001	0,007	<0,0001	ns	<0,0001	0,002
Calidad de la motilidad (0-5)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,01	<0,0001	0,0006
Espermatozoides vivos (%)	ns	0,0005	<0,0001	0,01	ns	<0,0001
Espermatozoides normales (%)	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns

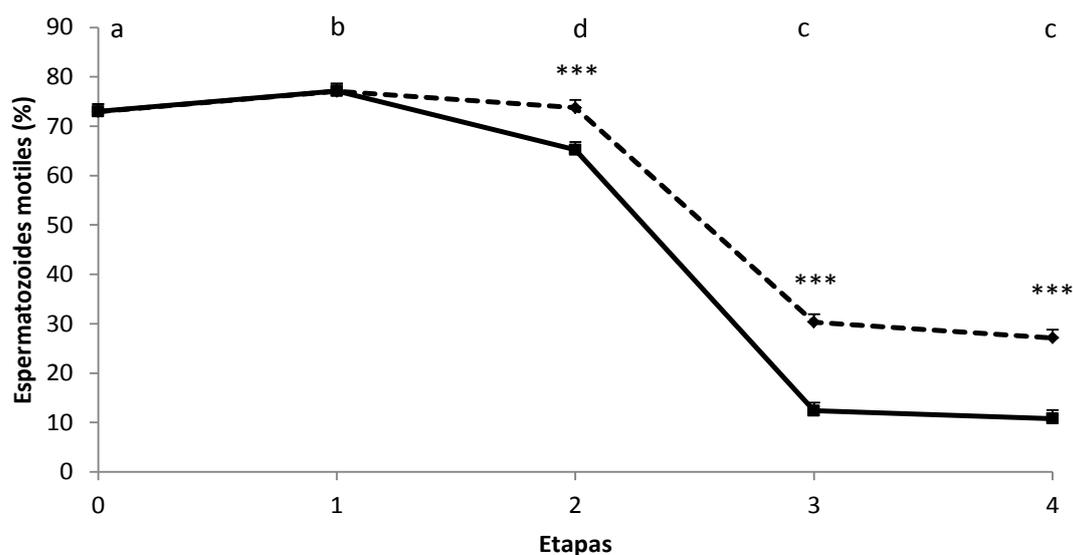
ns: diferencias no significativas

### 5.1 Espermatozoides motiles

El porcentaje de espermatozoides motiles fue mayor con la técnica de congelación clásica que con la vitrificación cinética ( $56,2 \pm 0,8$  % vs  $47,7 \pm 0,8$  %;  $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides motiles a lo largo de los días de colección (Figura 1) y de las diferentes etapas (Figura 2). Se apreció una tendencia a aumentar a lo largo del tiempo, de los valores para ambas técnicas, también un aumento de los valores en la etapa 1 (purificación) y en las etapas subsiguientes, una disminución para ambas técnicas. Además se presentaron interacciones entre la técnica y la etapa de procesamiento (etapa 2,  $P = 0,0003$ ; etapa 3,  $P < 0,0001$ ; etapa 4,  $P = 0,0001$ ) e interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa. Sin embargo, no se encontró interacción entre la técnica y los días de colección seminal.



**Figura1:** Porcentaje de espermatozoides motiles de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de los días de colección seminal, para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas a lo largo de los días ( $P < 0,05$ ).

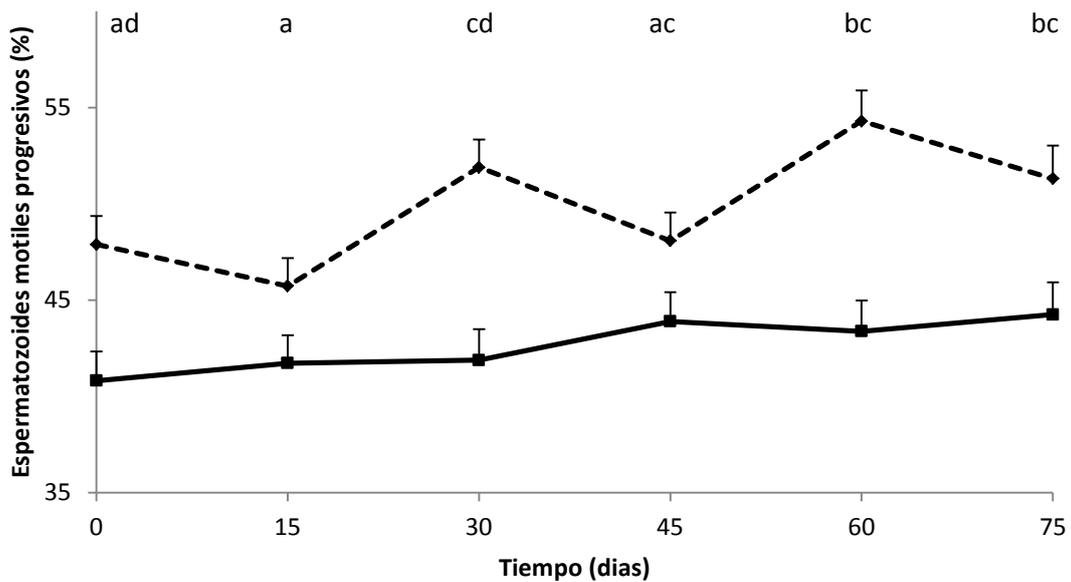


**Figura 2:** Porcentaje de espermatozoides motiles de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de las etapas de procesamiento (0: semen fresco, 1: semen purificado, 2: semen con diluyente, 3: semen descongelado/desvitrificado, 4: semen purificado una vez descongelado/desvitrificado) para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de las etapas ( $P < 0,05$ ); las diferencias significativas entre las técnicas, en una misma etapa se indican con \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

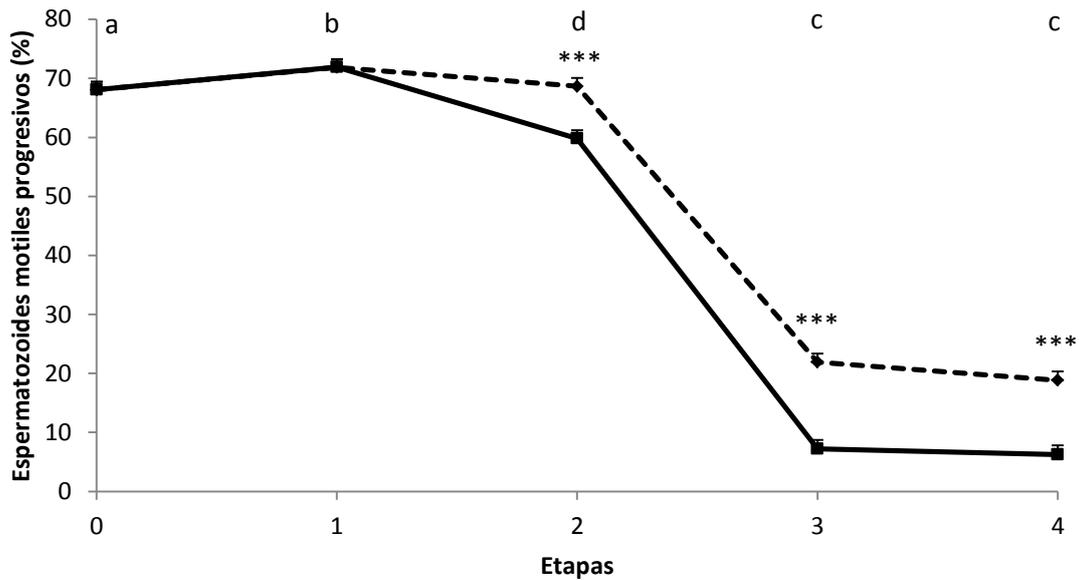
## 5.2 Espermatozoides con motilidad progresiva

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor mediante la técnica de congelación clásica que con la vitrificación cinética ( $49,9 \pm 0,7 \%$  vs  $42,6 \pm 0,7 \%$ ;  $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas

en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a lo largo de los días de colección (Figura 3) y de las diferentes etapas (Figura 4). Se apreció una tendencia a aumentar a lo largo del tiempo, de los valores para ambas técnicas, también un aumento de los valores en la etapa 1 (purificación) y en las etapas subsiguientes, una disminución para ambas técnicas. Además se presentaron interacciones entre la técnica y la etapa de procesamiento (etapa 2,  $P < 0,0001$ ; etapa 3,  $P < 0,0001$ ; etapa 4,  $P < 0,0001$ ), e interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa. Sin embargo no se encontró interacción entre la técnica y los días de colección seminal.



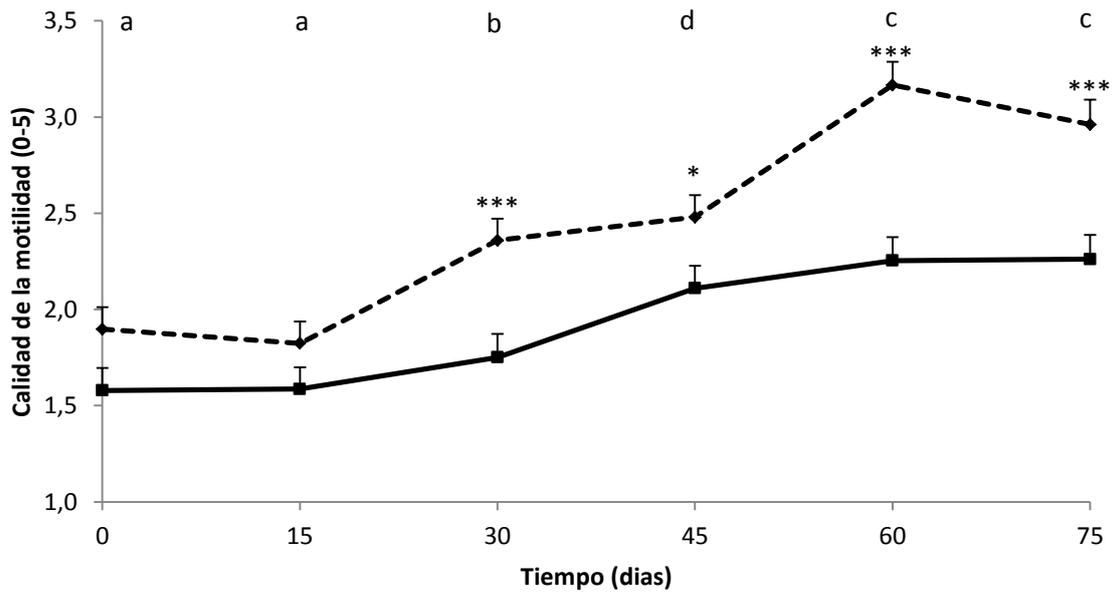
**Figura 3:** Porcentaje de espermatozoides motiles progresivos de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de los días de colección seminal, para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de los días ( $P < 0,05$ ).



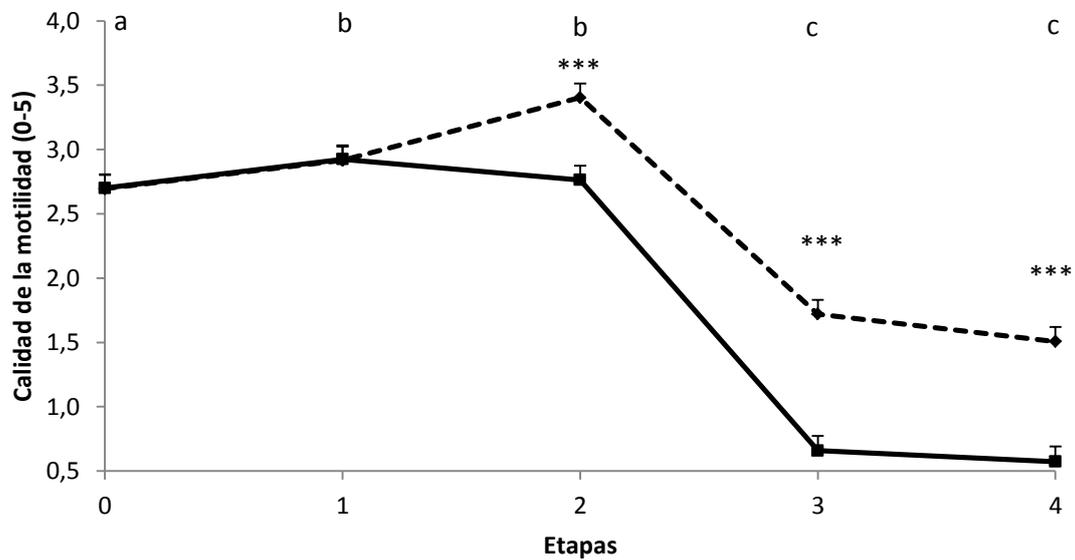
**Figura 4:** Porcentaje de espermatozoides motiles progresivos de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de las etapas de procesamiento (0: semen fresco, 1: semen purificado, 2: semen con diluyente, 3: semen descongelado/desvitrificado, 4: semen purificado una vez descongelado/desvitrificado) para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de las etapas ( $P < 0,05$ ); las diferencias significativas entre las técnicas, en una misma etapa se indican con \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

### 5.3 Calidad de la motilidad

La calidad de la motilidad fue mayor mediante la técnica de congelación clásica, en comparación a la vitrificación cinética ( $2,4 \pm 0,07$  vs  $1,9 \pm 0,07$ ;  $P < 0,0001$ ). Se encontraron diferencias significativas en la calidad de la motilidad espermática a lo largo de los días de colección (Figura 5) y de las diferentes etapas (Figura 6). Se apreció una tendencia a aumentar a lo largo del tiempo, de los valores para ambas técnicas. Además se presentaron interacciones entre la técnica y los días de colección seminal (día 30,  $P = 0,0005$ ; día 45,  $P = 0,03$ ; día 60,  $P < 0,0001$  y día 75,  $P = 0,0002$ ). También se encontró interacciones entre la técnica y la etapa de procesamiento (etapa 2,  $P = 0,0001$ ; etapa 3,  $P < 0,0001$  y etapa 4,  $P < 0,0001$ ) e interacción entre la técnica, el tiempo y la etapa.



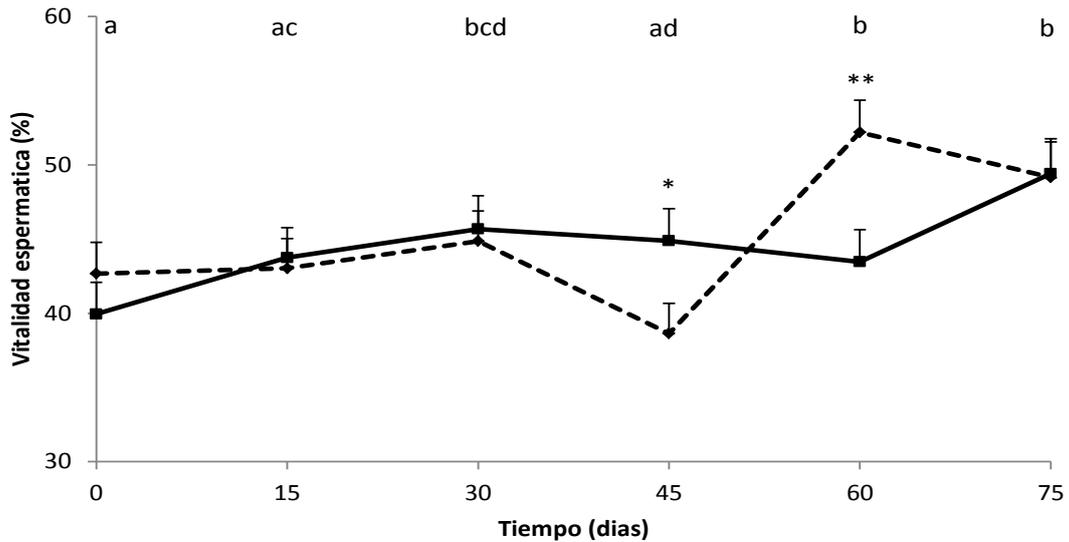
**Figura 5:** Calidad de la motilidad espermática de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de los días de colección seminal, para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (---◆---). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de los días ( $P < 0,05$ ); las diferencias significativas entre las técnicas, en un mismo día se indican con \* ( $P < 0,05$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ).



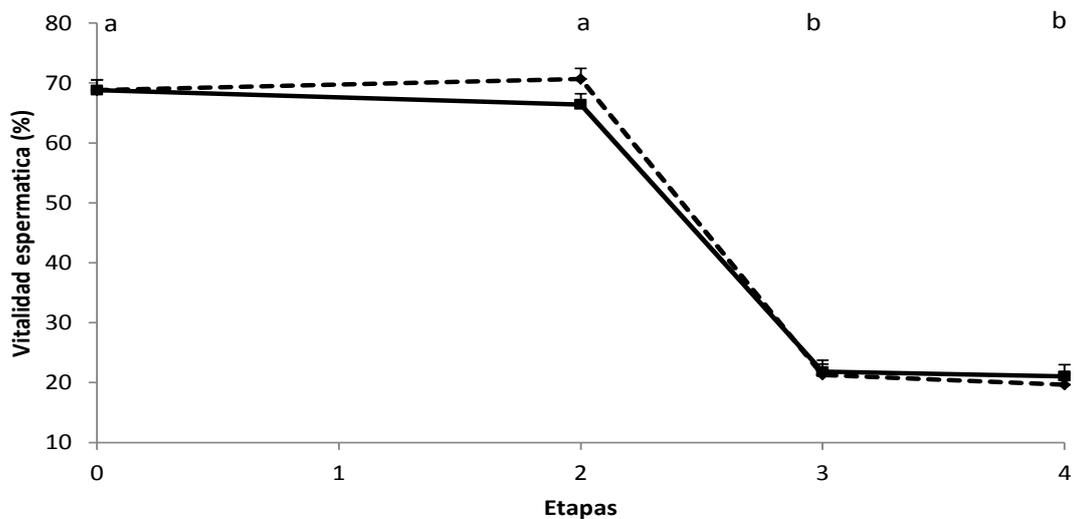
**Figura 6:** Calidad de la motilidad espermática de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de las etapas de procesamiento (0: semen fresco, 1: semen purificado, 2: semen con diluyente, 3: semen descongelado/desvitrificado, 4: semen purificado una vez descongelado/desvitrificado) para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (---◆---). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de las etapas ( $P < 0,05$ ); las diferencias significativas entre las técnicas, en una misma etapa se indican con \*\*\* ( $P < 0,001$ ).

#### 5.4 Espermatozoides vivos

El porcentaje de espermatozoides vivos no presentó diferencias significativas a favor de ninguna de las dos técnicas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas a lo largo de los días de colección (Figura 7) y de las diferentes etapas (Figura 8). Además existieron interacciones entre la técnica y los días de colección (día 45,  $P=0,04$ ; día 60,  $P=0,006$ ), al igual que entre la técnica, el tiempo y la etapa, pero no se encontró interacción entre la técnica y la etapa de procesamiento.



**Figura 7:** Porcentaje de vitalidad espermática de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de los días de colección seminal, para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (---◆---). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de los días ( $P<0,05$ ); las diferencias significativas entre las técnicas, en un mismo día se indican con \* ( $P<0,05$ ), \*\* ( $P<0,01$ ).

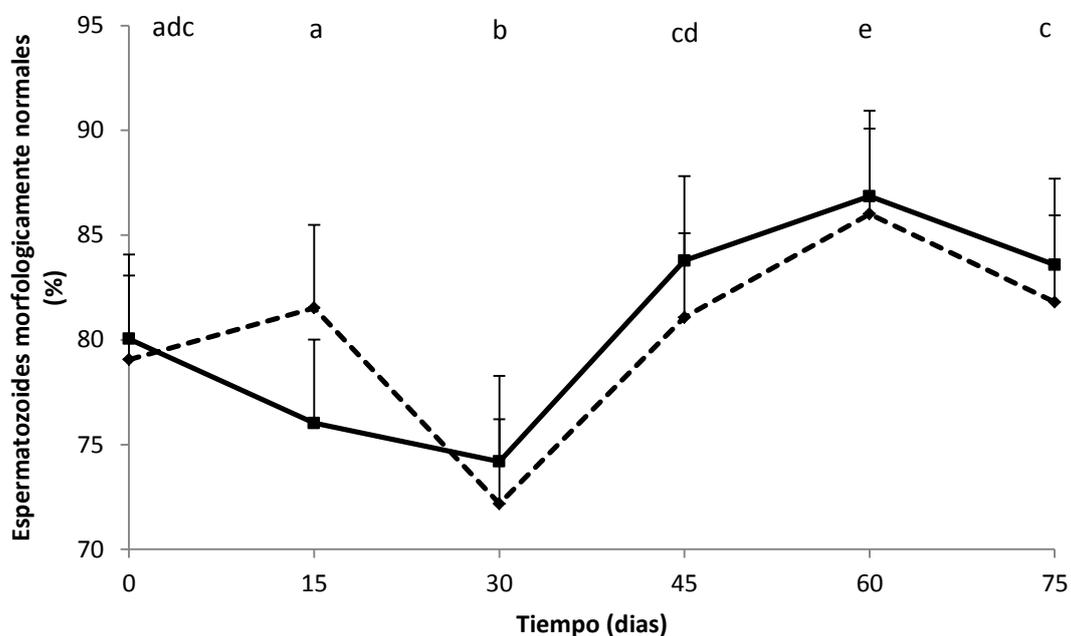


**Figura 8:** Porcentaje de vitalidad espermática de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de las etapas de procesamiento (0: semen fresco, 2: semen con

diluyente, 3: semen descongelado/desvitrificado, 4: semen purificado una vez descongelado/desvitrificado) para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de las etapas ( $P < 0,05$ ).

### 5.5 Espermatozoides normales

El porcentaje de espermatozoides normales no mostró diferencias significativas a favor de ninguna de las técnicas. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas a lo largo de los días de colección (Figura 9), aunque no a lo largo de las etapas de procesamiento. No se presentó interacción entre la técnica y los días de colección seminal, así como tampoco entre la técnica y las etapas de tratamiento espermático. Tampoco se encontró interacción entre la técnica, el tiempo y las etapas.



**Figura 9:** Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales de chivos de Gabón, durante la estación reproductiva, a lo largo de los días de colección seminal, para las técnicas de vitrificación cinética (—■—) y congelación clásica (—◆—). Diferentes letras indican diferencias significativas en las técnicas, a lo largo de los días ( $P < 0,05$ ).

## 6. Discusión

En el presente trabajo el porcentaje de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva y la calidad de la motilidad fueron mayores con la técnica de congelación clásica que con la vitrificación cinética. Otros trabajos, como el de Isachenko y col. (2004) y Restrepo y col. (2012) han obtenido resultados similares entre ambas técnicas, pero con el uso de semen humano y semen equino respectivamente. Sus resultados difieren de los del presente trabajo, donde surgen diferencias significativas para algunos de los parámetros analizados entre las técnicas. Posiblemente, los resultados diferentes entre los trabajos se justifiquen por la utilización de especies distintas. Los espermatozoides humanos contienen componentes intracelulares que hacen a la matriz intracelular altamente viscosa, por lo que podrían actuar como crioprotectores naturales. Además la pequeña cabeza espermática y su bajo contenido en agua serían un beneficio frente a la criopreservación en general y a la vitrificación en particular, por la velocidad ultrarrápida de enfriamiento (Isachenko y col. 2004). La cabeza del espermatozoide humano tiene unas dimensiones de  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de largo  $3,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de ancho y un área de  $12,9 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$  (Maree y col., 2010), mientras que en la cabeza del espermatozoide de chivo, las dimensiones son de  $8,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$  de largo  $4,3 \pm 0,02 \mu\text{m}$  de ancho y un área de  $29,9 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$  (Tabarez, 2014). El mayor tamaño y contenido de agua podrían hacer al espermatozoide de chivo más sensible que al espermatozoide humano frente a velocidades ultrarrápidas de enfriamiento (Isachenko y col., 2004). Además de la influencia que puede tener la morfología espermática en la criopreservación, también debe agregarse la influencia de la técnica en sí misma. Las metodologías de criopreservación utilizadas por Restrepo y col. (2012) difieren de las del presente trabajo. Se utilizaron diferentes procesos de enfriamiento y de calentamiento. Además, en el trabajo de Restrepo utilizaron un diluyente comercial, suplementado con yema de huevo y como crioprotector, dimetilformamida para ambas técnicas, pero en concentraciones diferentes.

En el presente trabajo los resultados luego de la desvitrificación (espermatozoides motiles:  $12,4 \pm 1,7 \%$ ; espermatozoides con motilidad progresiva  $7,2 \pm 1,5 \%$ ) y los obtenidos por Pradiee y col. (2015), fueron similares (espermatozoides motiles:  $13,7 \pm 1,3 \%$ ; espermatozoides con motilidad progresiva:  $1,5 \pm 0,4 \%$ ). Se utilizó un protocolo de vitrificación y desvitrificación similar al de Pradiee y col. (2015), donde se usó sacarosa como ACP, con una concentración de 100mM, un tiempo de equilibrado de 30 min a  $5^\circ\text{C}$  y una desvitrificación a  $60^\circ\text{C}$ . Con el protocolo utilizado por Pradiee y col. (2015) en espermatozoides caprinos, demostraron además la posibilidad de una criopreservación espermática exitosa, por la capacidad de fertilización espermática, post desvitrificación. A pesar de las similitudes entre estos trabajos, se puede observar que muchos de los resultados obtenidos por

Pradiee y col. (2018) son mejores a los del presente trabajo. Posiblemente esto se deba a que los protocolos se adecuaron mejor al animal utilizado por Pradiee y col. (2018), el Ibex ibérico (*Capra pyrenaica*) pertenecientes al mismo género pero a distinta especie que las cabras domesticas (*Capra hircus*) utilizada en este trabajo. El origen de los espermatozoides se podría plantear como otro factor que influyó en los resultados, ya que en el trabajo de Pradiee y col. (2018) fueron epididimarios (extraídos *post mortem*) y no por eyaculación. Las membranas de los espermatozoides se modifican durante la maduración epididimal, adoptando la infraestructura y la fluidez correctas para los eventos que conducen a la fertilización (Ladha, 1998). Los espermatozoides de origen epididimario resistirían mejor a condiciones de estrés criobiológicamente relevantes, mientras que los espermatozoides eyaculados mostrarían una mayor sensibilidad (Varisli y col., 2009).

Este trabajo fue realizado durante la estación reproductiva de los chivos de Gabón, por otro lado, Aristegui y col. (2017) realizaron la comparación entre la congelación y la vitrificación seminal utilizando los mismos animales y obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo, pero durante la estación no reproductiva. Santiago-Moreno y col. (2009) demostraron que en caprinos salvajes (*Ibex ibérico*) es posible la congelación seminal con buenos resultados, fuera de la estación reproductiva. Por otra parte, utilizaron diferentes alternativas de diluyentes para congelar y la que dio mejores resultados fue la misma que se utilizó en el presente trabajo. Los cambios endocrinos dependientes de la estacionalidad interfieren en la congelabilidad del espermatozoide, directamente en la propia célula o indirectamente en la composición del plasma seminal (Santiago-Moreno, 2014). La testosterona podría tener influencia en forma directa sobre el espermatozoide determinando variaciones en la composición de su membrana, lo que en última instancia afectaría su fluidez. Estos cambios en las membranas plasmáticas del esperma pueden alterar su capacidad de resistir la criopreservación (Coloma y col., 2011). Aunque, la respuesta espermática a los procesos de congelación y descongelación, podría no estar del todo asociada al patrón anual de secreción de la testosterona, en los chivos de Gabón (Viera, 2018). Además en este trabajo se realizó la purificación de todas las muestras de forma tal que se extrajo el plasma seminal, por lo que la fosfolipasa no sería un factor que influya en los parámetros seminales evaluados. Sin embargo, se esperarían mejores resultados en la estación reproductiva de la especie, esto probablemente se deba a que esta raza de chivos es proveniente de una zona de estacionalidad poco marcada. Oppong y Yebuah (1981) y Khanum (2006) afirman que esta raza de chivos no es estacional en base a estudios realizados en Ghana y en Pakistán. Esto explicaría porque los resultados durante la estación reproductiva y no reproductiva sean similares.

Considerando, que la vitrificación seminal es una técnica rápida, sencilla y de bajo costo, pero de reciente utilización, es importante continuar con su desarrollo. Además resultaría interesante su aplicabilidad ya sea con fines productivos como de conservación de especies.

## **7. Conclusión**

La congelación clásica permitió la obtención de mejores resultados de criopreservación seminal que la vitrificación cinética durante la estación reproductiva de los chivos de Gabón.

## **Bibliografía**

- 1) Aisen E.G. (2004). Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires. Intermedica, 216 p.
- 2) Arav A., Yavin S., Zeron Y., Natan D., Dekel I., Gacitua H. (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187 (1 - 2): 77 – 81.
- 3) Arav A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81 (1): 96 – 102.
- 4) Aristegui F., Machado C., Urioste V. (2017). Comparación entre la efectividad de la crio preservación y la vitrificación seminal en chivos durante la estación no reproductiva. Tesis de grado, Universidad de la Republica, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 36 p.
- 5) Ávila-Portillo L.M., Madero J.I., López C., León M.F., Acosta L., Gómez C., Delgado L.G., Gómez C., Lozano J.M., Reguero M.T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57 (4): 291 - 300.
- 6) Bailey J.L., Blodeau J.F., Cormier N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21 (1): 1-7.
- 7) Bradshaw W.E., Holzapfel C.M. (2007). Evolution of Animal Photoperiodism. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*, 38: 1 – 25.
- 8) Bronson F.H. (1985). Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biology of Reproduction*, 32 (1): 1 – 26.
- 9) Builtrago J., Pérez L.M. (2008). Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Tesis de grado, Universidad de la Salle, Facultad de Medicina Veterinaria, Bogotá D.C., 80 p.
- 10) Clarke I.J., Cummins J.T., de Kreiser D.M. (1983). Pituitary gland function after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. *Neuroendocrinology*, 36 (5): 376 – 384.
- 11) Coloma M.A., Toledano-Diaz A., Castaño C., Velazquez R., Gomez-Brunet A., Lopez-Sebastian A., Santiago-Moreno J. (2011). Variación estacional en el estado fisiológico reproductivo en el íbice ibérico (*Capra pyrenaica*) y su relación con la congelabilidad de los espermatozoides. *Theriogenology*, 76 (9): 1695 – 1705.

- 12) Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (1996). Anatomia Veterinaria. Buenos Aires. Medica Panamericana, 845p.
- 13) Fernandez S., Sestelo A., Rivolta M., Cordoba M. (2013). Capacitation and acrosome reaction induction on thawed Dama dama deer spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent supplement. Zoological Science, 30 (12): 1110 – 1116.
- 14) Gadea J. (2003) Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión. Disponible en: [https:// www.engormix.com/porcicultura/articulos/los-diluyentes-inseminacion-artificial-t26019.htm](https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/los-diluyentes-inseminacion-artificial-t26019.htm). Fecha de consulta 4/9/2018.
- 15) Gao D., Critser J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR Journal, 41 (4): 187-196.
- 16) Giriboni J., Lacuesta L., Ungerfeld R. (2017). Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. Theriogenology, 87: 284 - 289.
- 17) Holt W.V (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62(1-3): 3 – 22.
- 18) Iritani A., Nishikawa Y. (1962). Studies on the egg-yolk coagulating factor (enzyme) in goat semen III. Coagulation action to the fractionated yolk. Veterinary Zootechnology, 17: 322 – 365.
- 19) Isachenko V., Isachenko E., Katkov LI., Montag M., Dessole S., Nawroth F., Van Der Ven H. (2004). Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. Biology of Reproduction, 71 (4):1167 – 1173.
- 20) Isachenko E., Isachenko V., Katkov LI., Rahimi G., Schondorf T., Mallmann P. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. Human Reproduction, 19 (4): 932 – 939.
- 21) Karsch F.J., Bittman E.L., Foster D.L., Goodman R.L., Legan S.J., Robinson J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. Recent Progress in Hormonal Research, 40: 185 – 232.
- 22) Khanum S.A., Hussain M., Kausar R. (2006). Manipulation of estrous cycle in Dwarf goat (*Capra hircus*) using estrumate under different management conditions. Animal Reproduction Science, 92: 97-106.

23) Ladha S. (1998). Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized cell, the Mammalian Spermatozoon. *Journal of Membrane Biology*, 165 (1): 1-10.

24) Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62 (1 - 3): 113 – 141.

25) Malpaux B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. En: Neill J.D., (Ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3<sup>ed</sup>. Missouri, Elsevier Academic Press, v.2, p. 2231 – 2281.

26) Maree L., du Plessis S.S., Menkveld R., van der Horst G. (2010). Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction*, 25 (6): 1369 – 1382.

27) Martin G.B., Ford J.R., Purvis I.W. (1990). Environmental and genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. En: Oldham C.M., Martin G.B., Purvis I.W. (Eds.) *Reproductive physiology of Merino sheep concepts and consequences*. Perth, University of Western Australia, p. 109 - 129.

28) Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247 (3): C125-C142.

29) Oppong E.N.W., Yebuah N.M.N. (1981). Some production traits of the West African Dwarf goat. *Tropical Animal Health and Production*, 13: 208-212.

30) Pradiee J., Estes M.C., Lopez-Sebastian A., Toledano-Diaz A., Castaño C., Carrizosa J.A., Urrutia B., Santiago-Moreno J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84 (9): 1513 – 1522.

31) Pradiee J., Sanchez Calabuig M.J., Castaño C., O'Brien E., Estes M.C., Beltran Breña P., Maillo V., Santiago-Moreno J., Rizos D. (2018). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 108: 314 – 320.

32) Purdy P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63 (3): 215 -225.

33) Quan G.B., Wu G.Q., Wang Y.J., Li D.J. (2016). Effects of the Tris, Tes or skim milk based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Ruminant Research*, 134: 14 – 21.

34) Restrepo G., Duque J.E., Montoya J.D. (2012). Efecto de dos protocolos de crio preservación sobre la capacidad fecundante de semen equino (*Equus caballus*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65 (2): 6717- 6724.

35) Ritar A.J., Salamon S. (1982). Effects of seminal plasma and of 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 Science*, 35 (3): 305 – 312.

36) Sánchez A., Tsutsui T. (2002). Evaluación de dos diluyentes seminales para la preservación refrigerada de espermatozoides de gato. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 7 (4): 249 – 253.

37) Sánchez A., Cartagena A., Berland M. (2006). Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17 (1): 1-7.

38) Santiago-Moreno J., Coloma M.A., Dorado J., Pulido-Pastor A., Gomez-Guillamon F., Salas-Vega R., Gomez-Brunet A., Lopez-Sebastian A. (2009). Criopreservación del espermatozoide Ibx (*Capra Pyrenaica*) obtenido por electroeyaculación fuera de la temporada de celo. *Theriogenology*, 71 (8): 1253 – 1260.

39) Santiago-Moreno J. (2014). Influencia del estatus endocrino en la respuesta a la congelación y vitrificación de espermatozoides de pequeños rumiantes: uso de rumiantes silvestres y domésticos como modelo experimental. Memoria científico-técnica de proyectos individuales. Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España, 30p.

40) Saporiti A., Catalano R. (2005). Uso de leche fluida descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado equino. Disponible en: <https://www.albítar.portalveterinaria.com/noticia/3499/articulos-otros-temas-archivo/uso-de-leche-fluida-descremada-ultrapasteurizada-como-diluyente-de-semen-refrigerado-equino>. Fecha de consulta 4/9/2018.

41) Stevenson T.J., Ball G.F. (2011). Information theory and the neuropeptidergic regulation of seasonal reproduction in mammals and birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278 (1717): 2477 – 2485.

42) Stocco D.M., Mc Phaul M.J. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. En: Neill J.D., (Ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3º ed. Missouri, Elsevier Academic Press, p. 977 – 1016.

43) Sztejn J.M., Tekeo T., Nakagata N. (2018). History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 82: 57 – 63.

44) Tabarez Rojas A. (2014). Optimización del protocolo de criopreservación del semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Barcelona, 264 p.

45) Thiéry J.C., Chemineau P., Hernandez X., Migaud M., Malpau B. (2002). Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 87 – 100.

46) Tilbrook A.J., Clarke I.J. (2001). Negative Feedback Regulation of the Secretion and Actions of Gonadotropin – Releasing Hormone in Males. *Biology of Reproduction*, 64(3): 735 – 742.

47) Trejo C.A., Meza V.V.M., Antonio E.C., Cotera R.J., Antonio-Cisneros C.M. (2013). Agua de coco como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Archivo de Zootecnia (Córdoba)* 62 (238): 299 – 302.

48) Varisli O., Uguz C., Agca C., Agca Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110 (3 - 4): 256 – 268.

49) Viera M. (2018). Estacionalidad y criopreservación de semen en chivos de Gabón. Tesis de maestría, PEDECIBA-BIOLOGIA, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, 59 p.

50) Watson P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481-492.