

EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA A TRAVÉS DEL SISTEMA C.A.S.A DE SEMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO BAJO DIFERENTES MEDIOS DILUYENTES

MOTILITY SPERM EVALUATION SYSTEM THROUGH C.A.S.A GOAT SEMEN UNDER DIFFERENT MEDIA CRYOPRESERVED DILUENTS

Leonardo Hernández-Corredor¹ | Alexander Nivia-Osuna² | Daniel Hernández-Villamizar³ | Jorge Rubio-Parada⁴
Armando Quintero-Moreno⁵

Forma de citar: HERNÁNDEZ-CORREDOR Leonardo, NIVIA-OSUNA Alexander, et al., Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. Respuestas. 2013; 18(2): 16-27.

RESUMEN

El estudio evaluó la motilidad espermática y su efecto postdescongelación en semen caprino, en dos medios comerciales (Andromed® y TwoStep®) y diferentes protocolos de congelación (medio completo, con adición del 10% de yema de huevo, semen centrifugado y sobrenadante seminal), se utilizaron machos de la raza alpina de la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, el semen fue colectado con electroeyaculador, una vez los medios terminados y parte de los contenidos seminales enteros o centrifugados mezclados, se estabilizó por 2 horas, se envasó en pajillas de 0,5 cc y se congela en vapores de nitrógeno por 10 minutos, las pajillas se llevaron al laboratorio de Andrología de la Universidad del Zulia y por medio del sistema C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Análisis) se evaluaron los parámetros de motilidad como velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad lineal (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (ALH), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (BCF), los datos fueron analizados por medio del procedimiento GLM de SAS versión 9.0; los mejores índices de motilidad (VCL, ALH, BCF) fueron expresados en el tratamiento de contenido seminal centrifugado en medio Andromed®. (p≤0,001)) La mejor progresividad espermática (VSL, LIN, STR) se presentó en el tratamiento de Semen completo de caprino, criopreservado en medio comercial TwoStep®.

Palabras clave: semen, cabras, Andromed, Twostep.

ABSTRACT

The study evaluated the effect sperm motility and sperm post-thawing in goats, two commercial means (Andromed ® and Two Step ®) and different freezing protocols (complete medium with 10% addition of the egg yolk, semen centrifuged supernatant and seminal), we used males of the Alpine race of the University Francisco de Paula Santander Ocaña, semen was collected with electroejaculator once finished media and part of the whole and centrifuged seminal contents mixed, stabilized by two

Recibido:
Febrero 12 de 2013

Aceptado:
Julio 22 de 2013

¹ Magister en Ciencias Agrarias
Universidad Francisco de Paula
Santander
leonardohc@ufps.edu.co
Cúcuta – Colombia

² Magister en Ciencias
Veterinarias
alexander.nivia@unad.edu.co
Bogotá – Colombia

³ Magister en Producción
Animal
Universidad Francisco de Paula
Santander
daniel.hernandez@ufps.edu.co
Ocaña – Colombia

⁴ Magister en Ciencias Agrarias
Universidad Francisco de Paula
Santander
jorgealexanderrp@ufps.edu.co
Cúcuta - Colombia

⁵ Doctor en Ciencias
Veterinarias
Universidad del Zulia
armando.quintero@fcv.luz.
edu.ve
Maracaibo - Venezuela

hours, packed in 0.5 cc straws and frozen in nitrogen vapor for 10 min, the straws were taken to the laboratory of Andrology at the University of Zulia and through CASA system (Computer Assisted Sperm Analysis) were evaluated motility parameters such as curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), linear velocity (VAP), linearity index (LIN), straightness index (STR) Oscillation Index (ALH) average amplitude of the lateral displacement of the sperm head (BCF), the data were analyzed by the GLM procedure of SAS version 9.0, the highest rates of motility (VCL, ALH, BCF) were expressed in the treatment of seminal content centrifugation Andromed® medium. ($p \leq 0.001$) The best progressive sperm (VSL, LIN, STR) will present the full Semen treatment goats, cryopreserved at Two Step® commercial medium.

Keywords: semen, buck, Andromed, Two step.

INTRODUCCIÓN

Los parámetros espermáticos clásicos que se consideran en un análisis de calidad seminal incluyen en general la motilidad, concentración y vitalidad espermática; así como, las anomalías morfológicas (Quintero-Moreno *et al.*, 2003). Las principales razones por las cuales las pruebas de evaluación seminal rutinaria no han podido demostrar una clara relación predictiva con la resistencia a la criopreservación y con el potencial reproductivo de un semental se debe a que no se refleja adecuadamente la fisiología o funcionalidad de la población de espermatozoides que permanecen viables y también a que existen diferencias técnicas procedimentales, lo que afecta su repetitividad. Otra es que la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual de gran subjetividad, por lo que generan una alta variabilidad entre laboratorios y operarios (Gravance y Davis, 1995; Foxcroft *et al.*, 2008).

La criopreservación de semen caprino presenta desafíos para los programas de conservación y bancos de germoplasma debido a la falta de un protocolo óptimo de crioconservación (Purdy, 2006). Esta especie posee enzimas del tipo fosfolipasa "A" que actúan sobre los fosfolípidos de los diluyentes normalmente utilizados liberando lisolectinas y ácidos gra-

dos que son tóxicos para los espermatozoides (Pellicer-Rubio *et al.*, 1997; Pellicer-Rubio y Combarnuus, 1998; Sias *et al.*, 2005). La centrifugación y la eliminación del plasmaseminal (lavado) es realizado para mejorar localidad del semen criopreservado, en especial cuando se utiliza diluyentes que contienen yema de huevo oleche (Leboeuf *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha comprobado que centrifugar el semen pueden ocasionar pérdidas o daños en los espermatozoides (Miro *et al.*, 2009). Por lo cual, existen controversias sobre la necesidad de retirar el plasma seminal en el proceso de congelación (Azerêdo *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2007; Sariozkan *et al.*, 2010.)

Estudios reportan la utilización de diferentes tipos de diluyentes como la lecitina de soya en lugar de yema de huevo para evitar la reducción en la motilidad y obtener un mejor resultado postdescongelación (Roof *et al.*, 2012). El diluyente a base de la soya (Bioxcell®) arrojó resultados satisfactorios (Gacitua y Aray, 2005; Nordstoga *et al.*, 2011). De igual forma, Sariozkan *et al.*, (2010) reportó mayores valores de motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A. para espermatozoides caprinos congelados en Bioxcell® en comparación con un medio de yema de huevo a base de Tris. Por otro lado, el centrifugado del semen no mejoró los resultados de motilidad espermática para un diluyente a base

de yema de huevo (Roof *et al.*, 2012). Reportes afirman que la lecitina de soya y yema de huevo difieren en su composición de lípidos y contenido de ácidos grasos, afectando la interacción con las enzimas lipasas presentes en el contenido seminal de los caprinos (Palacios y Wang, 2005, Le Grandois *et al.*, 2009).

El desarrollo de nuevas tecnologías *in vitro* como la citometría de flujo o los sistemas C.A.S.A. (Computer Assisted Sperm Analysis), permite el estudio de múltiples características funcionales y morfológicas de los espermatozoides para intentar predecir su capacidad fecundante (Quintero-Moreno *et al.*, 2011). El C.A.S.A. fue propuesto por Dotty Foster (1979) y en la actualidad es usado en centros de andrología humana y veterinaria. Flowers (1997) mostró cómo el porcentaje de espermatozoides móviles únicamente proporciona una estima cuantitativa de la fertilidad y su uso se limita cuando se alcanzan valores superiores. Broekhuijse *et al.* (2012) mostraron correlaciones negativas en algunos parámetros C.A.S.A. vs la fertilidad. Según Amann y Katz (2004), consideran que la mayor velocidad resultante es lo mejor, pero no existe una evidencia biológica. Se ha reportado que diferentes parámetros tienen efectos opuestos sobre los índices de preñez y el número de animales nacidos. Así como, la velocidad curvilínea (VCL) y la frecuencia de batido de cabeza (BCF) explican la variación en los índices de preñez, mientras que la velocidad media (VAP), índice de linealidad (VSL), y la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza de espermatozoide (ALH) explican la variación en el número de crías.

El conocimiento preciso y objetivo de las velocidades cinemática como la calidad de movimiento de los espermatozoides contenidos en las muestras de material seminal criopreservado es el mejor indicador de su calidad (Ávila-Portillo *et al.*, 2006), ya que se ha encontrado una correlación significativa entre la motilidad y la fertilidad en bovinos (Budworth *et al.*, 1988), equinos (Samper *et al.*, 1991), humanos (Hirano *et al.*, 2001), conejos (Lavara *et al.*, 2005), y porcinos (Vyt *et al.*, 2008).

Por tal motivo el objetivo del presente estudio fue evaluar parámetros de motilidad y progresión espermática a través del sistema C.A.S.A de muestras de material seminal caprino criopreservado en diferentes medios diluyentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y colecta de semen

Se evaluaron 5 machos caprinos de la raza Alpina entre 10 y 14 meses de edad y de fertilidad conocida, adscritos a la unidad de caprinos de la Universidad Francisco de Paula Santander (UFPS) sede Ocaña. Los animales fueron mantenidos bajo una dieta estándar. La colecta de semen fue realizada por medio de electroeyaculación (Electroyac 5®). Las muestras fueron mantenidas en baño maría a 37°C hasta su análisis.

Evaluación y criopreservación de muestras

Se realizó la evaluación convencional del material seminal a nivel macroscópico [volumen (mL), pH] y microscópico [motilidad masal (%) e individual (%), concentración espermática (spz/mL) y anomalías morfológicas (%)]. Las muestras clasificadas como óptimas fueron sometidas a dilución en los siguientes protocolos para su posterior criopreservación.

Tratamiento 1 (TwoStep®): Semen completo en medio comercial TwoStep®.

Tratamiento 2 (Andromed®): Semen completo en medio comercial Andromed®.

Tratamiento 3 (Sobrenadante en TwoStep®): Sobrenadante de centrifugación de contenido seminal criopreservado en medio comercial TwoStep® (solo con adición del 10 % de yema de huevo).

Tratamiento 4 (Centrifugado en Andromed®): Centrifugado de contenido seminal en medio comercial Andromed®.

Tratamiento 5 (Centrifugado en Two Step®): Centrifugado de contenido seminal en medio comercial comercialTwoStep®.

Las muestras de semen fueron diluidas en cada uno de los tratamientos a 37°C y equilibradas por un periodo de 2 horas. Se envasaron en pajillas (0,5 mL) a una concentración promedio de 100×10^6 espermatozoides/mL y posteriormente fueron llevadas a -110°C por 10 min y sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento.

Valoración de los parámetros C.A.S.A.

Las pajillas fueron transportadas al Laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (Venezuela) en un termo-tanque (MVE®, Millenium), donde se procedió a realizar la valoración de los parámetros C.A.S.A. (MICROPTIC®, Versión 2002, Barcelona, España) y evaluadas bajo un aumento 100 X (Olympus BX40, Olympus Optical Co., Ltda.). Se evaluó un total de 5 pajillas por tratamiento, previamente colocadas a 37°C durante 5 minutos en un baño maría. El análisis se realizó sobre alícuotas de semen de 5 μ L en láminas Leja® (20 micras - 4 cámaras). Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo, la velocidad de captura de cada imagen fue de 1 cada 40 microsegundos.

Se evaluó el porcentaje de espermatozoides progresivos (PRO, %), concentración de espermatozoides progresivos por dosis (spz/mL), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad media (VAP, μ m/s), índice de linealidad (LIN, promedio entre VSL/VCL), índice de rectitud (STR, promedio entre VSL/VAP), índice de oscilación (WOB, promedio entre, VAP/VCL), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, μ m) y frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz) (Mortimer, 1997).

Análisis estadístico

Se estimaron los promedios y se aplicó la prueba de varianza y la prueba de compara-

ción de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Por medio del procedimiento GLM del software SAS versión 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la motilidad del semen después de diferentes protocolos de dilución, y se observó que la criopreservación alteró la calidad del semen para los diferentes diluyentes. En la investigación se tiene en cuenta que el T5 (Centrifugado en TwoStep®) Semen centrifugado de caprino, criopreservado en medio comercial Two Step® no sobrevivió ningún espermatozoide al protocolo de congelación, por ende no se evaluó. La enzima coagulante de la yema de huevo (EYCE), fosfolipasa secretada al plasma seminal por las glándulas bulbo-uretrales, hidroliza la lecitina de la yema y es tóxico para el espermatozoide caprino (Gacitua y Arav, 2005). Estos autores recomiendan que el lavado del semen caprino se puede evitar en diluyentes con un contenido de yema de huevo por ejemplo, <1,5%, pero el lavado es una necesidad para la concentración de yema de huevo estándar > 10%. Konyali *et al.* (2013) en diluyentes de Tris-yema y leche descremada incluyeron ciclodextrinas con colesterol, antes de la criopreservación, y se mejoró el número de espermatozoides móviles y viables después de la criopreservación.

En la concentración de espermatozoides progresivos se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$), el mejor tratamiento lo mostró T4 (Centrifugado en Andromed®) con 12,6 millones de Spz/ml móviles progresivos (Tabla 1). Krishnakumara *et al.* (2011) En su estudio con espermatozoide de *Bison bison* presentó resultados similares al usar Andromed® comparado con diluyentes que se le adiciona yema de huevo. Ellos concluyen que el uso de un extensor libre de proteína animal. Andromed® es un diluyente comercial que contiene fosfolípidos derivados a partir de extracto de soja.

Tabla 1. Parámetros de progresividad y concentración para las muestras seminales postcongelación de semen caprino

Parámetros		T1 TwoStep®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de TwoStep®	T4 Concentrado en Andromed®
Espermatozoides Estáticos (%)	ProgresividadNo. spz (%)	747 (74,1) ^c	819 ^b (71,5 %)	381 ^d (70,6 %)	1401 ^a (69,6 %)
	Concentración (millones de Spz/ ml)	22,2 ^c	41,9 ^a	20,3 ^d	35,9 ^b
Espermatozoides no Progresivos (%)	Progresividad	172 ^c (17,1 %)	294 ^b (25,7 %)	140 ^d (25,9 %)	366 ^a (18,2 %)
	Concentración (millones de Spz/ ml)	5,1 ^d	15,1 ^a	7,5 ^c	9,4 ^b
Espermatozoides Progresivo (%)	Progresividad	89 ^b (8,8 %)	32 ^c (2,8 %)	19 ^d (3,5 %)	245 ^a (12,2 %)
	Concentración (millones de Spz/ ml)	2,6 ^b	1,6 ^b	1,0 ^c	12,6 ^a
Total	Concentración (millones de Spz/ ml)	30,0	58,6	28,8	51,6

Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P \geq 0,05$)

Autores como Karagiannidis et al. (2000), evaluaron semen de animales de la raza Alpina y Saanen; reportaron valores de motilidad espermática en semen fresco de 59,8 % y 64,4 %, respectivamente. En estudios realizados con semen criopreservado utilizando medios diluyentes como TRIS y leche se obtuvieron valores de movimiento rápido progresivo postdescongelación de 34,4 % y 33,1%, respectivamente. Vallecillo et al. (2004) evaluaron la motilidad individual postdescongelación de espermatozoides criopreservados en el diluyente Triladyl® con 20 % de yema de huevo y centrifugado a 500 g por 6 minutos, obteniendo un valor de 60,5 %. Dubeibe et al. (2007), utilizaron los diluyentes de citrato de sodio más yema de huevo y leche descremada más yema de huevo y los valores de motilidad postdescongelación a las 5 horas fue de 0,19 % y 0 %, respectivamente. Dorado et al. (2009), trabajando con en el primer centrifugado con Biladyl® y con Triladyl® (20 % de yema) como diluyente de criopreservación, obtuvieron 56,07 % de motilidad. Según Nava y Coronado (2010), evaluaron la motilidad es-

permática post-congelación y obtuvieron porcentajes de motilidad de 38,6 % para espermatozoides criopreservados con el diluyente Tris-yema y 35,3% con el Triladyl®. Silvestre et al. (2011) estudiaron la adición de Glicerol (6%) y Dimetilsulfoxido (6%) con un diluyente de Tris-yema, reportaron motilidad de 23,9 % y 16,6 % respectivamente. Roof et al. (2012) con Bioxcell® lograron una motilidad de 49,40 %, mientras que con un diluyente con yema de huevo solo lograron 19,69%. Konyali et al. (2013), trabajando con diluyentes de Tris-yema al 2 %, al 20 % de yema y leche descremada, reportaron motilidades de 58,2 %, 70,1 % y 69,7% y al incluir colesterol con ciclodextrinas (1mg) obtuvieron 72,6 %, centrifugando el esperma en Tris (dos veces) y luego estandarizando con un tris-buferizado. Esto indica que existe una alta variabilidad en los valores de motilidad espermática postdescongelación debido a diversos factores como el tipo de diluyente, fracción del eyaculado, biotipo racial y metodología utilizada tanto para el procedimiento de congelación como la valoración de la capacidad fecundante.

La motilidad progresiva presentó diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$), T4 (Centrifugado en Andromed®), presentó un 30,4 % seguido de T3 (Sobrenadante en TwoStep®) con un 29,4 % y T1 presentó la más baja motilidad con 25,9 %; logrando resultados mejores que los presentados por Tuli y col. (1992) en un estudio con semen congelado caprino obtuvieron 25 % de motilidad postdescongelación; Kozdrowski *et al.* (2007), con un protocolo de I (con 20 % adición de yema de huevo) consiguió un 23 % de motilidad postdescongelación, con el protocolo II (con un 1,5 % de yema de huevo) un 19

% y Dubeibe *et al.* (2007) tuvieron resultados más bajos. Mejores resultados reporta Dorado *et al.* (2009). Pero autores como Valencia *et al.* (1994), Dorado, (2003); Vallecillo *et al.* (2004); Castilho *et al.* (2009); Nava y Coronado (2010) y Daskins *et al.* (2011), obtuvieron resultados superiores, aclarando que no utilizaron C.A.S.A. para la evaluación postdescongelación. Konyali *et al.* (2013), obtienen resultados muy buenos, con más preparación del contenido seminal (dos centrifugaciones, estandarización, adición de colesterol con ciclodextrinas) antes de la congelación.

Tabla 2. Parámetros (ALH y BCF) de Motilidad para las muestras seminales postcongelación de semen caprino

Parámetros		T1 TwoStep®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de TwoStep®	T4 Concentrado en Andromed®
Espermatozoides progresivos	ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,2 ^b	1,8 ^c	1,7 ^c	2,7 ^a
	BCF (Hz)	6,3 ^b	4,9 ^d	5,5 ^c	10,2 ^a
Espermatozoides Progresivos Medios	ALH ($\mu\text{m/s}$)	1,8 ^a	1,8 ^a	1,4 ^b	1,9 ^a
	BCF (Hz)	4,8 ^a	4,5 ^b	1,7 ^d	3,6 ^c
Espermatozoides Progresivo Rápidos	ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,8 ^a	1,9 ^b	1,8 ^b	2,9 ^a
	BCF (Hz)	8,3 ^b	5,2 ^d	6,9 ^c	12,3 ^a

ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide, BCF: Frecuencia de batida, Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P \geq 0,05$)

En los demás parámetros se observó diferencias altamente significativas ($P \leq 0,001$) El T4 (Centrifugado en Andromed®) obtuvo los menores índices de velocidad lineal (VSL), un intermedio STR, un buen ALH y un VCL progresivo. Para espermatozoides progresivos rápidos en el parámetro de VAP, mostró promedios altos para T2 (TwoStep®) con 89,8 mm/s, T4 (Centrifugado en Andromed®) con 48,4 mm/s. mostró que no llegaron los espermatozoides a estar hiperactivados y se mantienen en el rango como apto para fecundación. En el parámetro LIN Los valores de altos fueron de T3 (Sobrenadante en TwoStep®) con 83,4 % para los espermatozoides progresivos rápidos; mientras que T4 (Centrifugado en Andromed®) presentó un 50,8 %, sin llegar a hiperactivarse (Quintero- Moreno y col. 2003). El LIN y ALH parecen ser indicadores de hiperactivación espermatozoides (Peña y Linde-Forsberg; 2000). Según Cox *et al.* (2006) determinaron la correlación entre los parámetros de C.A.S.A. para semen de caprino y la migración de los espermatozoides con un homólogo de moco cervical y demostraron que valores de LIN > 50%.

El BCF lo presentó T4 (Centrifugado en Andromed®) fue de 12,3 Hz. En el índice WOB T4 (Centrifugado en Andromed®) 60,8 mm/s. mostro un valor intermedio (Tabla 2 y 3).

Tabla 3. Parámetros de motilidad para las muestras seminales postcongelación de semen caprino

Parámetros		T1 TwoStep®	T2 Andromed®	T3 Sobrenadante de TwoStep®	T4 Concentrado en Andromed®
Espermatozoides Móviles	VCL $\mu\text{m/s}$	39,1 ^b	20,3 ^d	21,9 ^c	46,1 ^a
	VSL $\mu\text{m/s}$	24,1 ^a	9,4 ^d	15,6 ^c	21,7 ^b
	VAP $\mu\text{m/s}$	30,5 ^a	13,8 ^d	18,1 ^c	27,5 ^b
	LIN (%)	61,6 ^b	46,3 ^d	71,3 ^a	47,0 ^c
	STR (%)	79,0 ^b	68,4 ^c	86,2 ^a	78,7 ^b
	WOB (%)	77,9 ^b	67,7 ^c	82,7 ^a	59,7 ^d
Espermatozoides Lentos	VCL $\mu\text{m/s}$	15,2 ^c	15,8 ^b	13,4 ^d	16,5 ^a
	VSL $\mu\text{m/s}$	6,2 ^c	7,5 ^a	7,7 ^a	7,1 ^b
	VAP $\mu\text{m/s}$	9,9 ^{bc}	10,8 ^a	9,8 ^c	10,0 ^b
	LIN (%)	40,4 ^d	47,6 ^b	57,8 ^a	43,0 ^c
	STR (%)	62,4 ^d	69,4 ^c	79,0 ^a	70,9 ^b
	WOB (%)	64,8 ^c	68,7 ^b	73,2 ^a	60,7 ^d
Espermatozoides Medios	VCL $\mu\text{m/s}$	34,5 ^b	33,0 ^c	23,0 ^d	35,2 ^a
	VSL $\mu\text{m/s}$	16,7 ^a	14,5 ^b	12,0 ^d	12,5 ^c
	VAP $\mu\text{m/s}$	24,2 ^a	21,8 ^b	16,3 ^d	19,1 ^c
	LIN (%)	48,3 ^b	43,9 ^c	52,1 ^a	35,6 ^d
	STR (%)	68,8 ^b	66,4 ^c	73,5 ^a	65,6 ^d
	WOB (%)	70,3 ^b	66,1 ^c	70,9 ^a	54,3 ^c
Espermatozoides Rápidos	VCL $\mu\text{m/s}$	103,7 ^a	39,5 ^d	92,1 ^b	79,6 ^c
	VSL $\mu\text{m/s}$	79,3 ^a	15,3 ^d	76,8 ^b	40,4 ^c
	VAP $\mu\text{m/s}$	89,8 ^a	22,4 ^d	84,0 ^b	48,4 ^c
	LIN (%)	76,5 ^b	38,8 ^d	83,4 ^a	50,8 ^c
	STR (%)	88,3 ^b	68,5 ^d	91,5 ^a	83,5 ^c
	WOB (%)	86,6 ^b	56,7 ^d	91,1 ^a	60,8 ^c

VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación, Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P \geq 0,05$)

Un VCL superior y ALH son indicativos de espermia hiperactivado Kathiravan *et al.* (2010). Un VCL significativamente mayor y un ALH para T1 (TwoStep®) podría sugerir una tendencia a la hiperactivación de los espermatozoides con presencia de proteínas de origen animal en el diluyente. Velocidades más altas (VAP, VSL y VCL) en los espermatozoides fueron detectados después de la crioconservación en T1 (TwoStep®), lo que contrasta con lo reportado por Januskauskas *et al.* (2003) en semen bovino. Leite *et al.* (2010) reportó mayor VSL en diluyentes con lecitina de soja y superiores ALH en diluyentes con yema de huevo, sugiriendo que estas diferencias podrían ser por los cambios en la densidad y la viscosidad de los dos diluyentes. Para el parámetro STR se observa dife-

rencias altamente significativas ($P \leq 0,001$), siendo el valor utilizado para definirlos espermatozoides que son considerados progresivos un 80% (Bravo *et al.* 2011), en la tabla 3. T3 (Sobrenadante de TwoStep®) presento mejores valores con un 90.74 %; T4 (Centrifugado en Andromed®) 83.58 %. El LIN provee una indicación de la relación entre la trayectoria recta recorrida y la trayectoria promedio del espermatozoide, de modo que en situaciones en que la trayectoria promedio se aproxima de la trayectoria en línea recta se presenta una elevada STR, con bajo ALH (Quintero-Moreno y Rubio; 2008). En los datos se observó porcentajes altos para T3 (Sobrenadante de TwoStep®) con un 83.36% y un 50,80% para T4 (Centrifugado en Andromed®)

Comparando los resultados con los obtenidos por Dorado *et al.* (2009) y Konyali *et al.* (2013), se puede concluir que un manejo antes de la congelación de al menos dos centrifugados al semen para eliminar el plasma seminal y estabilizar el semen en medios de baja toxicidad, da resultados excelente para la criopreservación de semen caprino.

CONCLUSIONES

Centrifugar el semen caprino, es la mejor alternativa para la congelación, debido a que no se adiciona el plasma seminal porque en él hay fosfolipasas procedentes de la secreción de las glándulas bulbouretrales, que van a interferir con la yema de huevo o la leche descremada, incluidas habitualmente en los medios de congelación por su acción crioprotectora, dando lugar a sustancias tóxicas para los espermatozoides. No obstante, aunque los valores de movilidad postdescongelación pueden diferir ampliamente con respecto al de semen criopreservado debido a que existe poca información sobre parámetros C.A.S.A para caprinos.

El porcentaje de movilidad local presentado por T4 (Centrifugado en Andromed®), ésta representado básicamente por aquellos espermatozoides que mostraron un movimiento vibratorio, ésta movilidad podría estar afectada directamente por falta de adquisición completa de la movilidad después del proceso de crioconservación.

Los diluyentes con lecitina de soja son relativamente baratos, muy fáciles de usar, pero hasta el momento no se tiene información sobre efectos adversos en la fertilidad.

El mejor tratamiento fue T4 (Centrifugado en Andromed®), ya que presentó los mejores promedios para los índices de motilidad y motilidad progresiva en el estudio. El tratamiento T1 (TwoStep®) presentó problemas por hiperactivación de los espermatozoides, luego de la observación de los promedios obtenidos.

REFERENCIAS

Amann, R. y Katz, D. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25:317-325.

Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.; Gómez, C., Lozano, J. y Reguero, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 57 No. 4. (291-300).

Azerêdo, G., Esper, C. y Resende, K. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin Res;* 41:257-63.

Bag, S.; Joshi, A.; Naqvi, S.; Rawat, P. y Mittal J. 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 72: 175-183.

Bravo, J., Montanero, J., Calero, R. y Roy, T. 2011. Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec.* 60 (232): 1087-1094.

Broekhuijse, M., Sostaric, E., Feitsma H. y Gadella M. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J ANIM SCI*, 90:779-789

Budworth, P. R., R. P. Amann, and P. L. Chapman. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.* 9:41-54.

Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. y Gracia A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod.Domest. Anim;*40:191-5.

Caiza de la Cueva FI; Rigau T.; Bonet S; Miro

J; Briz M.; Rodríguez J. 1997. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, 47: 765-784.

Camacho, O. 2011. Criocapacitación de espermatozoides caprinos, procesados con dos diluyentes. Tesis de grado. Universidad Veracruzana. 54 p

Castilho, E., Guimarães, J., Martins, L., Oliveira, R.; Facioni, S. y Borela C. 2009. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *R. Bras. Zootec.*, v.38, n.12, p.2335-2345.

Cox, F.; Alfaro, V., Montenegro, V.; Rodríguez-Martínez, H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus, *Theriogenology*, 66: 860-867.

Daskin, A., Kulaksiz, R., Akçay, E. y Erol, H. 2011. The Effect of Different Dilution Rates of Angora Buck Semen Frozen with Bioxcell Extender on the Post-thaw Quality. *J Fac Vet Med UnivErciyes* 8(1), 23-26.

Dott HM, Foster GC. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J Reprod Fertil* 1979;55:161-166.

Dorado, J. 2003. Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria.

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. y Rodríguez, I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112 :150-157.

Dubeibe, D., Pinzón, B.; Salazar, P. y Serrano, C. 2007. Comparación de dos diluyentes para el congelamiento de semen caprino de la raza santandereana. *Rev Col CiencPec*; 20:4, 535.

Flesh, F. y Gadella, B. 2000 Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochim.Biophys.Acta* 1469:197-235.

Flowers W.L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil* 52: 67-68.

Foxcroft, G., Dyck, M., Ruiz-Sanchez, A., Novak, S. y Dixon W. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology*, 70(8):1324-36.

Gacitua, H. y Arav, H. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63:931-938

Gravance CG, Davis RO. Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. *J. Androl.* 1995, 16:88-93

Hirano, Y., H. Shibahara, H. Obara, T. Suzuki, S. Takamizawa, C. Yamaguchi, H. Tsunoda, and I. Sato. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18:213-218.

Januskauskas A., Johannisson A., y Rodríguez-Martínez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60:743-58.

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K. y Kadirvel, G. 2010. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull Fertility using computer-aided system – A review. *Reprod.Domest.Anim*; doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x

Karagiannidis, A.; Varsakeli, S. y Karatzas, G. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, 53: 1285-1293.

Krishnakumara, S., Whiteside, D., Elkin, B. y Thundathila, J. 2011. Evaluation of an

animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (*Bison bison*) *Theriogenology*, 76:252–260

Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B., Auger, J. 1998. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis. *Human Reprod.* 13: 611-9.

Lavara, R., E. Moce, F. Lavara, M. Pilar Viudes de Castro, and J. Salvador Vicente. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64:1130–1141.

Lavara, R. 2009. Estimación de los parámetros genéticos y calidad seminal de los parámetros genéticos de producción y calidad seminal en una línea paternal de conejos. Universidad Politécnica de Valencia, 67 p.

Leboeuf, B., Restall, B. y Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim.Reprod.Sci*; 62:113– 41.

Leite, T., Do Vale Filho V., De Arruda, R., De Andrade, A., Emerick, L., Zaffalon, F., Martins, J. y De Andrade, V. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim.Reprod.Sci*;120: 31–8.

Le Grandois, J., Marchioni, E., Zhao, M., Giuffrida, F., Ennahar, S., y Bindler F. 2009. Investigation of natural phosphatidylcholine sources: separation and identification by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS2) of molecular species. *J Agric Food Chem* 2009;57:6014–20.

Marín-Briggiler, I., Tezón, J., Miranda, P., Vazquez-Levin, M. 2002. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *FertilSteril.* 77: 252-59.

Mortimer, S. y Mortimer, D. 1990. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J. Androl.* 11, 195.

Mortimer, D. 1994. *Practical Laboratory Andrology.* Oxford University press. Sydney IVF. Australia

Miro, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T. y Peñalba, A. 2009. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen *Theriogenology*, 72:1017–22.

Nava, A. y Coronado, L. 2010. Comparación de dos Diluyentes de Base Tris (Hidroximetilaminometano) Sobre la Motilidad del Semen Caprino Congelado-Descongelado. Tesis UDO. Monagas. 49 P

Nordstoga, A., Söderquist, L., Ådnøy, T. y Paulenz, H. 2011. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one- or two-step procedures. *Reprod.Domest. Anim*;46:82– 6.

Palacios, L. y Wang, T. 2005. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J Am Oil Chem Soc.*;82:571– 8.

Pellicer-Rubio, M., Magallon, T. y Combarous Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol.Reprod*;57:1023–31.

Pellicer-Rubio M. y Combarous Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J Reprod Fertil*;112:95–105.

Peña, A. y Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one or two step dilution and two-freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa, *Theriogenology*, 5: 859–875.

Peterson, K., Kappen, M., Ursem, P., Nothling, J., Colenbrander, B. y Gadella, M. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, 67:863–71.

Purdy, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*;63:215–25.

Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. 2003 Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59:1973-1990.

Quintero-Moreno A., Rubio-Guillen J. 2008. Evaluación de la calidad espermática en toro mediante tecnología informática. *Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito*. Capítulo LVIII, 707 714.

Quintero-Moreno A., González D., Garde J.J., Estes M., Fernández-Santos MR., Carvalho JL., Mejía W., León G. 2009. Valoración Morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XIX: 153-158.

Quintero-Moreno, A., Rubio-Guillén J., González-Villalobos D., Gutiérrez JC., Madrid-Bury N. y López-Brea JJ. 2011. Identification of cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship With field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. XXI, N^o 5, 403 – 407.

Roof, D., Bowley, S., Price, L. y Matsas, D. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, 77:412–420.

Samper, J., Hellander, J. y Crabo, B. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44:107–114.

Sariozkan, S., Bucak, M., Tuncer, P., Tasdemir, U., Kinet, H. y Ulutas, A. 2010. Effects

of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, 73:316–23.

Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B. y Carriere, F. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochim Biophys Acta*; 1686:169–80.

Silvestre, F., Bezerra, T., Castelo, A., Oliveira, R., Lima, G., Peixoto, G., Bezerra, A., Silva, A. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63: 263–266.

Tardif, S., Laforest J.P., Cormier N., Bailey J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology*, 52: 447-459.

Tomas, C. 2007. Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. *Universidad Politécnica de Valencia, España*, 46 p.

Valencia, J.; González, G., González, M. y Trejo, A. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *VetMéc.*, 25 (2) 127-131.

Vyt, P., D. Maes, C. Quinten, T. Rijsselaere, W. Deley, M. Aerts, A. de Kruif, and A. van Soom. 2008. Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 77:291–298.

Vallecillo, A.; Trigo, P.; Delgado, J.; Cabello, A.; Santos, E. y Tenorio, T. 2004. effects of cryopreservation on sperm motility in blanca-serrana andaluza goat. *South African Journal of Animal Science*, 34: 116-118.

White, D., Phillips, M., Bedford, M. 1990. Factors affecting the acrosome reaction in hu-

man spermatozoa. J ReprodFertil. 90: 71-80.

Zarazaga, L.; Guzman, J.; Dominguez, C.;
Perez, M. y Prieto R. 2009. Effects of season
and feeding level on reproductive activity and
semen quality in Payoya buck goats. Therioge-
nology, 71:1316–1325.