



# Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino

Josefa Martínez-Durán<sup>1</sup> ; Omar Duverger-Tellez<sup>1</sup> ; Namibia Díaz-Martínez<sup>1</sup> ; Lisbani Interian-Alvarez<sup>1</sup> ; Ramón Denis-García<sup>1</sup> ; Alejandro Palacios-Espinosa<sup>2\*</sup> Ph.D. .

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), Departamento de Genética y Biotecnologías, Cotorro, Loma de Tierra, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento de Ciencia Animal Y Conservación del Hábitat. La Paz, México.

\*Correspondencia: [palacios@uabcs.mx](mailto:palacios@uabcs.mx)

Recibido: Diciembre 2021; Aceptado: Julio 2022; Publicado: Julio 2022.

## RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar en un diluyo-conservador liofilizado a base de Tris, el efecto de la concentración de Sero Albúmina Bovina (BSA) en la congelabilidad del semen caprino, sin realizar el lavado seminal, comparado con un diluyo-conservador control de lactosa-leche descremada (DC), eliminando el plasma seminal por centrifugación. **Materiales y métodos.** Se determinó en 90 eyaculados, volumen, motilidad, concentración, viabilidad y morfología espermática. Los eyaculados aptos, fueron mezclados y el pool dividido en cinco porciones, cada una recibió una de 4 combinaciones liofilizadas a base de Tris-Glucosa-Ac. Cítrico y Glicerol, con diferentes concentraciones de BSA (0.1, 0.5%, 1 y 2%) o DC. Se congeló en pastillas de 0.1 ml en vapores de nitrógeno, y transcurridos 2 min., fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su descongelación, 7 días después, se determinaron: porcentaje de motilidad (30, 120 y 240 minutos), viabilidad, acrosomas dañados y anomalías totales (30 y 120 minutos) y se compararon mediante un modelo de Regresión Logística Binaria. **Resultados.** La mayor motilidad espermática y viabilidad ( $p < 0.05$ ) en los tres tiempos fue para 0.5%, 1% y 2 % de BSA, que fueron superiores al 0.1% de BSA y DC. Los acrosomas dañados y las anomalías totales a los 30 y 120 minutos fueron menores ( $p < 0.05$ ) para 0.5%, 1% y 2 % de BSA en comparación con el 0.1% y DC. **Conclusiones.** La crioconservación del semen caprino, no requiere lavado seminal por centrifugación si se utiliza como protector de membrana BSA al 0.5-2% en un diluyo-conservador liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico y Glicerol.

**Palabras clave:** Diluyente de semen; preservación de semen; plasma seminal (*Fuente: CAB*).

## ABSTRACT

**Objective.** Evaluate the effect of Bovine Serum Albumin (BSA) concentration on the freezability of goat semen in a Tris-based lyophilized preservative-diluter, without performing seminal washing, compared with a control preservative-diluter of lactose-skimmed milk (DC), removing the seminal plasma by centrifugation. **Materials and methods.** It will cover 90 ejaculates, volume, motility, concentration, viability, and sperm morphology. The fit ejaculates were mixed and the pool divided

### Como citar (Vancouver).

Martínez-Durán J, Duverger-Tellez O, Díaz-Martínez N, Interian-Alvarez L, Denis-García R, Palacios-Espinosa A. Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(Supl):e2632. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2632>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

into five portions, each receiving one of 4 lyophilized combinations based on Tris-Glucose-Ac. Citrus and Glycerol with different concentrations of BSA (0.1%, 0.5%, 1% and 2%) or DC. It was frozen in 0.1 ml pellets in nitrogen vapors, and after 2 min., They were stored in liquid nitrogen until thawing 7 days later, the following were determined: motility percentage (30, 120 and 240 minutes), viability, damaged acrosomes and total anomalies (30 and 120 minutes) and were compared using a Binary Logistic Regression model. **Results.** The highest sperm motility and viability ( $p < 0.05$ ) in the three times was for 0.5%, 1% and 2% of BSA, which were higher than 0.1% of BSA and DC. Damages acrosome and total abnormalities at 30 and 120 minutes were lower ( $p < 0.05$ ) for 0.5%, 1% and 2% of BSA compared to 0.1% and DC. **Conclusions.** The cryopreservation of goat semen does not require seminal washing by centrifugation if 0.5-2% BSA is used as a membrane protector in a lyophilized dilute-conservative based on Tris-Glucose-Citric Acid and Glycerol.

**Keywords:** Seminal extender; semen preservation; seminal plasma (*Source: CAB*).

## INTRODUCCIÓN

La congelación posibilita preservar espermatozoides por tiempo indefinido, sin embargo, para lograr el éxito en este proceso es necesario conocer las particularidades de las especies cuyos eyaculados se desea crio preservar (1).

El plasma seminal del caprino, a diferencia de otras especies posee un elevado contenido de Fosfolipasa A, enzima que reacciona con la yema de huevo (YH) y con la leche descremada (LD), elementos obligados en la composición del diluyo-conservador como protectores de membrana contra el choque frío (2), que se produce durante el período de equilibrio al enfriar desde 37°C a 5°C y transcurre posterior a la dilución y previo a la congelación. Esta reacción enzimática entre la Fosfolipasa A y la Lecitina de la YH o los Triglicéridos de la LD, produce ácidos grasos y lisolecitinas, sustancias tóxicas que afectan la población espermática y reducen la capacidad de congelación (3).

Se han utilizado diferentes métodos para minimizar o anular el efecto de la Fosfolipasa A del semen caprino; el procedimiento convencional ha sido la remoción del plasma seminal mediante el lavado asociado a centrifugación, donde también se pierden proteínas, azúcares y lípidos (4) necesarios para mantener las funciones vitales del espermatozoide.

Algunos autores proponen utilizar bajos porcentajes de yema de huevo en los diluyo-conservadores para minimizar este efecto (5), mientras otros recomiendan diluyo-conservadores que no contengan proteínas de origen animal (6). Estudios recientes señalan que la BSA protege la membrana espermática durante el shock de enfriamiento (7) y en otras

investigaciones se ha utilizado como sustituto de la YH (8). El uso de esta proteína como protector de membrana contra el choque frío en la composición del diluyo-conservador, pudiera posibilitar eliminar el paso del lavado por centrifugación, en el proceso de congelación del semen caprino.

En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar en un diluyo-conservador liofilizado a base de Tris, el efecto de la concentración de BSA en la congelabilidad del semen caprino, sin realizar el lavado seminal, comparado con un diluyo-conservador control compuesto por lactosa-leche descremada (DC), donde se eliminó el plasma seminal por centrifugación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Esta investigación se llevó a cabo en la Habana, Cuba, en el Laboratorio de Tecnología del Semen del Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), ubicado a 21° 31' 18.3" N 77° 46.87' O, con una temperatura promedio de 25°C y una humedad relativa del 80%.

**Animales.** Se utilizaron indistintamente como donantes de semen, dos machos caprinos de las razas Saanen, tres de la raza Alpina y seis de la raza Boer, con una edad entre 3 a 5 años, estabulados, ubicados individualmente y con una alimentación controlada y estable, a base de concentrados (1 kg diario/animal), forraje (5 kg diario/animal 2 veces al día), sales minerales y agua *ad libitum*.

**Colección y evaluación del semen.** Se procesaron un total de 90 eyaculados en 12 réplicas, la colección de semen se realizó mediante Vagina Artificial dos veces por semana,

siempre en presencia de una hembra en celo, que se encontraba atada a un cepo en la sala de monta. Inmediatamente después se valoró el volumen (ml) mediante colector graduado, el porcentaje de motilidad por evaluación al microscopio con un aumento de 40x, la concentración espermática ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) mediante conteo en cámara de Neubauer, el porcentaje de espermatozoides vivos (viabilidad) por tinción con eosina-nigrosina y el porcentaje de anomalías espermáticas totales (morfología) utilizando un microscopio de contraste de fase. Los eyaculados clasificados como aptos para ser procesados (volumen  $\geq 0.5$  ml; motilidad  $\geq 80\%$ ; concentración espermática  $\geq 3000 \times 10^6/\text{ml}$ ; viabilidad  $\geq 80\%$  y anomalías espermáticas totales  $\leq 20\%$ ), fueron mezclados y el pool fue dividido en cinco porciones.

**Diluyo-conservadores.** Se utilizó un diluyo-conservador compuesto por Tris (4.4g), Ácido Cítrico (2.3g) y Glucosa (0.74g) en 100 ml de agua bidestilada con cuatro niveles de BSA (D1:0.1%; D2:0.5%; D3:1% y D4:2%); y el diluyo-conservador control (DC) compuesto por lactosa (4g) y leche descremada (10g) en 100 ml de agua bidestilada; en todas las combinaciones se utilizó como antimicrobianos, penicilina con estreptomycin (1000 UI/ml- 1 mg/ml, respectivamente), las cinco formulaciones fueron liofilizadas. Previo a la dilución del semen, el volumen de cada medio liofilizado fue restituido, con agua bidestilada a 37°C y se le añadió el crioprotector, Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 0.2% (v/v) y Glicerol al 6% (v/v) para el control y Glicerol al 6% (v/v) para el resto de las combinaciones.

**Dilución del semen.** Cada porción de eyaculado procedente del pool, recibió el diluyo-conservador correspondiente según los cálculos realizados para la dilución y según el método de congelación a utilizar (lavado por centrifugación o no). Cuando se utilizó el diluyo-conservador liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico y BSA, en sus cuatro concentraciones, el semen fue diluido inmediatamente después de la colecta a una temperatura de 37°C, según los cálculos de dilución, sin realizar lavado seminal y en un solo paso. Cuando se utilizó el diluyo-conservador liofilizado control (DC), después de la evaluación del eyaculado, se eliminó el plasma seminal mediante el lavado por centrifugación (2500 rpm, durante 15 min.) para lo cual el semen fue diluido en solución ODT en una relación de volumen 1:9 (v/v; semen:ODT),

posteriormente se descartó totalmente el sobrenadante, utilizando una pipeta Pasteur y se le añadió el diluyo-conservador a 37°C en un solo paso, según los cálculos realizados para la dilución. La concentración espermática en todas las muestras fue de  $1.5 \times 10^9/\text{ml}$ . Después de la dilución, todas las muestras fueron evaluadas al microscopio para comprobar la motilidad antes ser sometidas al período de equilibrio.

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

**Congelación del semen.** La congelación del semen se realizó en pastillas de 0.1 ml en vapores de nitrógeno (-75°C), por goteo sobre una placa de acrílico situada a 4 cm de la superficie de éste, transcurridos 2 minutos, las pastillas de semen congeladas fueron depositadas en viales plásticos previamente identificados (código del semental, fecha de congelación, especie, medio de congelación, # de dosis) y depositadas en un termo con nitrógeno líquido (-196°C) donde permanecieron hasta su descongelación.

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

**Evaluación del semen descongelado (Test de incubación).** Después de la descongelación, las muestras permanecieron en Baño María a 37°C donde se determinó porcentaje de motilidad a los 30, 120 y 240 minutos, porcentaje de viabilidad (vivos), porcentaje de acrosomas dañados (roto o inexistente) y porcentaje de anomalías espermáticas totales (a los 30 y 120 minutos). Cada muestra fue evaluada por duplicado, por un técnico experimentado sin previo conocimiento de la identificación de las mismas.

Para determinar la motilidad post descongelación, se tomó 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra de semen descongelado, se depositó en un portaobjeto atemperado (37°C), sobre la gota se colocó un cubreobjeto atemperado y se observó al microscopio con platina térmica, con un aumento de 100x; se valoró en una escala de 0-100.

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó mediante el método de tinción con eosina-nigrosina, fueron contados 400 espermatozoides en un microscopio con platina calentable con un aumento de 1000X. Los espermatozoides que mostraban una tinción púrpura parcial o completa se consideraron no viables. Solo los espermatozoides que mostraban una exclusión estricta de la tinción se contaron como viables.

Para determinar los porcentajes de acrosomas dañados y anomalías espermáticas totales, se depositó 3 gotas de solución Glutaraldehido (Citrato de Sodio al 2.9% y 2 mL Glutaraldehido) y 1 gota de semen de cada muestra de semen descongelado en un portaobjeto atemperado a 37°C, se homogenizó y realizó una extensión muy fina en un porta objeto desgrasado, se secó y observó al microscopio de contraste de fase, se realizó el conteo de 400 espermatozoides (aumento de 1000x, en aceite de inmersión).

**Análisis estadístico.** Las variables motilidad, viabilidad (vivos), anomalías del acrosoma y anomalías totales, se analizaron utilizando un modelo de Regresión Logística Binaria (9), ajustando un modelo con dos predictores categóricos: el diluyente y el tiempo transcurrido, y como variable de respuesta la opción de que el espermatozoide presente motilidad, viabilidad (vivos), acrosomas dañados y anomalías totales.

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

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

Donde la respuesta fue: si hay motilidad, viabilidad (vivos) o anomalías en el semen.

Así, para probar que hay motilidad, el modelo fue el siguiente:

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

Donde:

$$Y' = -0.6941 + 0.0 (30 \text{ min}) - 0.1554 (120 \text{ min}) - 0.4232 (240 \text{ min}) + 0.0797 (\text{BSA al } 0.1\%) + 0.4374 (\text{BSA al } 0.5\%) + 0.4783 (\text{BSA al } 1\%) + 0.4725 (\text{BSA al } 2\%) + 0.1251 (\text{control})$$

Para determinar la probabilidad de supervivencia (vivos), el modelo fue:

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

Donde:

$$Y' = -0.6384 + 0.0602 (\text{BSA al } 0.1\%) + 0.3240 (\text{BSA al } 0.5\%) + 0.3707 (\text{BSA al } 1\%) + 0.3274 (\text{BSA al } 2\%) + 0.0935 (\text{control}) + 0.0 (30 \text{ min}) - 0.1801 (120 \text{ min})$$

Para determinar la probabilidad de anomalías totales, el modelo fue:

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

Donde:

$$Y' = -0.6268 - 0.1249 (\text{BSA al } 0.1\%) - 0.8338 (\text{BSA al } 0.5\%) - 0.8618 (\text{BSA al } 1\%) - 0.8237 (\text{BSA al } 2\%) - 0.6418 (\text{control}) + 0.000000 (30 \text{ min}) + 0.2426 (60 \text{ min})$$

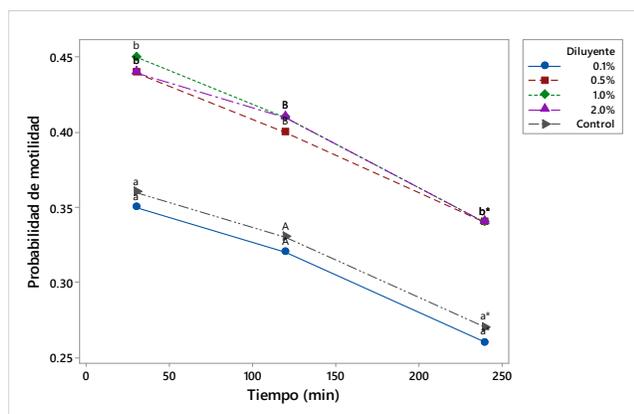
Para establecer la diferencia entre los diluyentes y los tiempos, respecto a las predicciones para cada uno de los modelos, se utilizaron los intervalos de confianza al 95% para cada una de dichas predicciones.

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

**Cumplimiento de normas éticas y de bienestar animal.** Se dio cabal cumplimiento a los artículos 47-52 del Capítulo VIII del Decreto Ley No.31 de Bienestar Animal de la República de Cuba.

## RESULTADOS

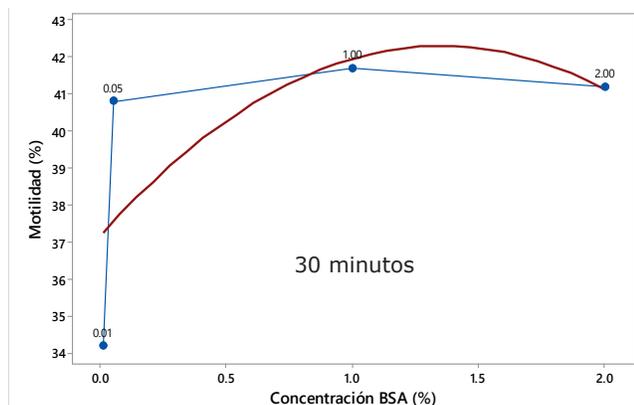
En la figura 1 se puede apreciar que la probabilidad de motilidad espermática fue mayor ( $p < 0.05$ ) en todos los tiempos para las concentraciones de BSA de 0.5, 1.0 y 2.0%, comparado con la concentración de 0.1% de BSA y el control. No hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones de BSA al 0.5, 1.0 y 2.0% en ninguno de los tres tiempos, de igual forma, la concentración de 0.1% de BSA y el control fueron iguales ( $p > 0.05$ ) en los tres tiempos. Se puede observar que en todos los tratamientos, la probabilidad de motilidad espermática sigue una tendencia lineal negativa en relación con el tiempo transcurrido.



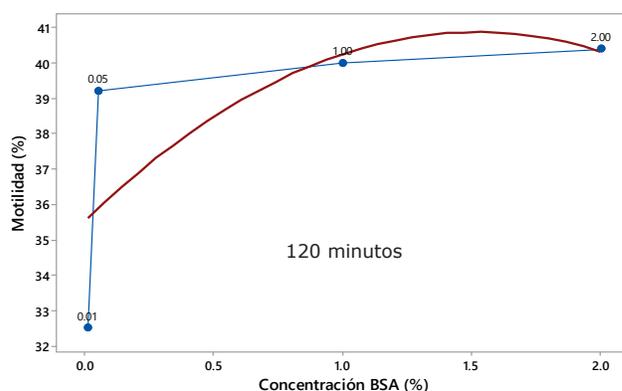
Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Efecto de la concentración de BSA y el Control, sobre la probabilidad de motilidad espermática a través del tiempo de incubación.

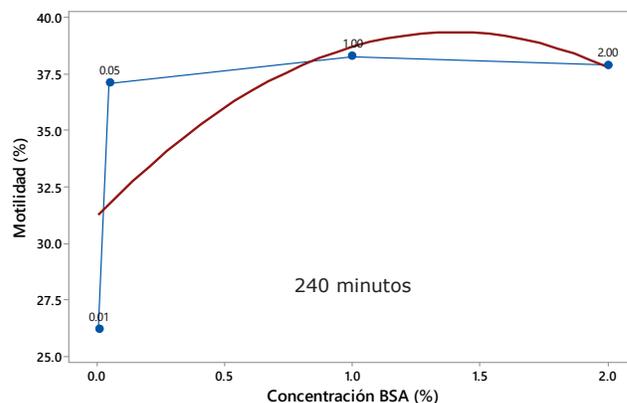
El efecto de la concentración de BSA sobre el porcentaje de motilidad a los 30, 120 y 240 min de incubación se muestra en las figuras 2, 3 y 4, respectivamente, donde se puede apreciar que en todos los tiempos la concentración de BSA respecto al porcentaje de motilidad, sigue una tendencia cuadrática. La concentración de 0.1% de BSA presentó porcentajes de motilidad de 34.2, 32.5 y 26.2%; la concentración de 0.5% de BSA 40.8, 39.17 y 37.1%; la concentración de 1.0% de BSA 41.7, 40.0 y 38.3%; la concentración de 2.0% de BSA 41.2, 40.4 y 37.9%, para los tiempos de 30, 120 y 240 minutos, respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de motilidad entre las concentraciones de BSA del 0.5, 1.0 y 2.0%, para los tres tiempos, fueron similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ) en todos los tiempos de incubación.



**Figura 2.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de motilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, a los 30 min. de incubación.

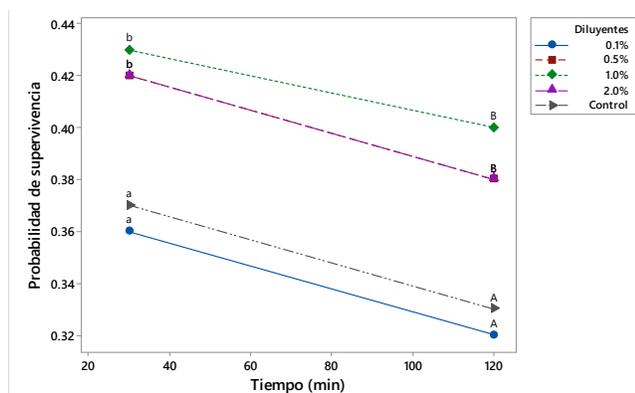


**Figura 3.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de motilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, a los 120 min. de incubación



**Figura 4.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de motilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, a los 240 min. de incubación.

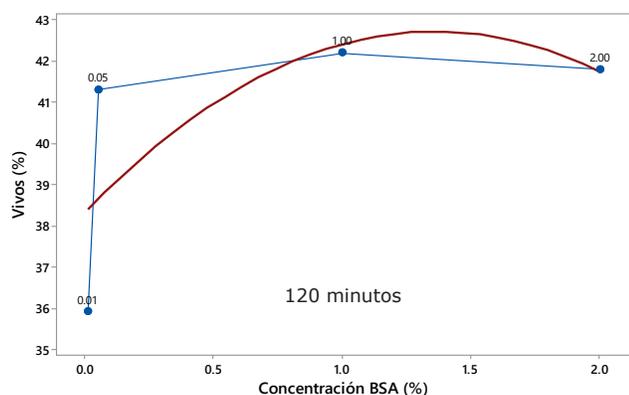
La probabilidad de viabilidad espermática post descongelación entre las concentraciones de BSA y el control durante el tiempo de incubación (30 y 120 minutos) se presenta en la figura 5, la viabilidad espermática para las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% de BSA fueron iguales entre si ( $p > 0.05$ ) dentro de cada tiempo, pero superiores ( $p < 0.05$ ) a la viabilidad observada para la concentración de 0.1% de BSA y el control, estos dos tratamientos fueron iguales entre si ( $p > 0.05$ ) dentro de cada uno de los tiempos. La probabilidad de viabilidad espermática para todos los tratamientos a través de los dos tiempos de incubación siguió una tendencia lineal negativa.



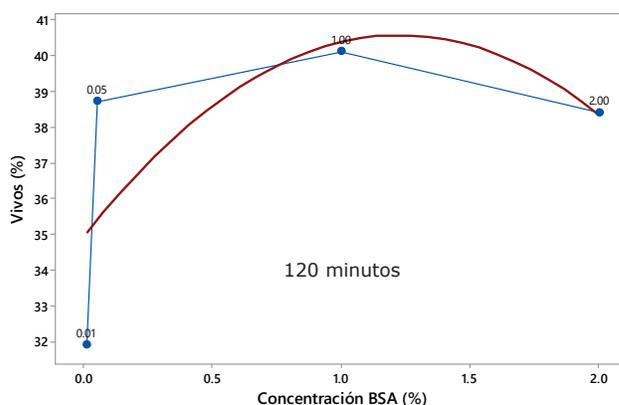
Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura 5.** Efecto de la concentración de BSA y el DC sobre la probabilidad de viabilidad espermática durante el test de incubación.

En las figuras 6 y 7 se aprecia el efecto de la concentración de BSA sobre el porcentaje de viabilidad espermática durante el test de incubación a los 30 y 120 minutos, respectivamente. La concentración más baja de BSA (0.1%), registró el menor porcentaje de motilidad (35.91%), sin embargo, al incrementar la concentración de BSA se alcanzan los porcentajes más elevados de viabilidad espermática (41.33, 42.25 y 41.83%, para D2, D3 y D4, respectivamente). Este comportamiento se mantuvo a los 120 minutos (31.91, 38.75, 40.08 y 38.41%, para D1, D2, D3 y D4, respectivamente).

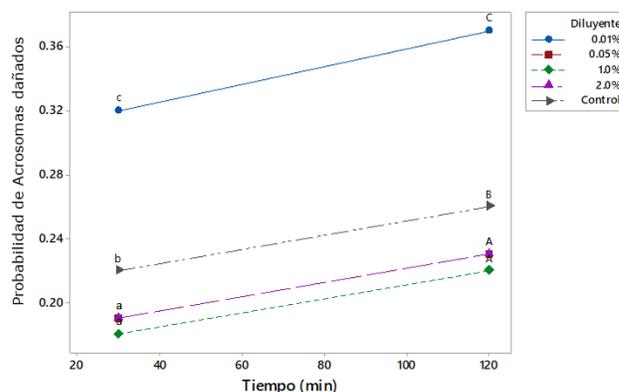


**Figura 6.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de viabilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, a los 30 minutos de incubación.



**Figura 7.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de viabilidad espermática del semen caprino congelado-descongelado, a los 120 minutos de incubación.

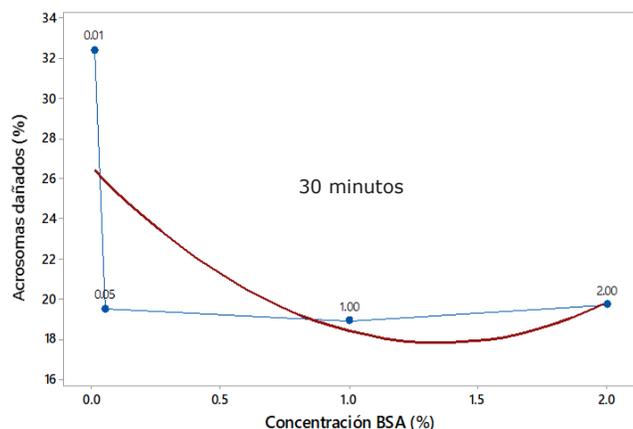
La probabilidad de acrosomas dañados post descongelación entre los diluyentes a base de BSA en sus cuatro diferentes concentraciones y el DC durante el test de incubación se presenta en la Figura 8. A los 30 minutos, la menor probabilidad de acrosomas dañados corresponde a las concentraciones de BSA de 0.5, 1.0 y 2.0%, no hubo diferencia entre ellas ( $p > 0.05$ ), el tratamiento control tuvo mayor probabilidad de acrosomas dañados ( $p < 0.05$ ) aunque inferior a la probabilidad que presentó la concentración de BSA al 0.1%. Este comportamiento para las concentraciones de BSA a los 30 minutos, se repitió a los 120 minutos.



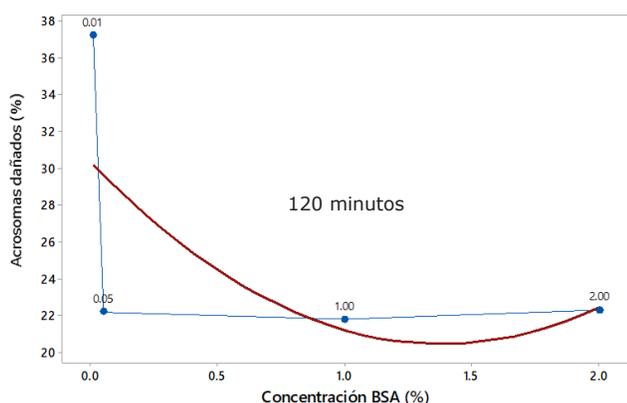
Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura 8.** Efecto de la concentración de BSA y DC sobre la probabilidad de acrosomas dañados durante el test de incubación.

En las figuras 9 y 10 se muestra el comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de acrosomas dañados durante el test de incubación a los 30 y 120 minutos, respectivamente. A los 30 minutos, se observa que D1 (0.1% BSA) presentó el mayor porcentaje de acrosomas dañados (32.42%), las concentraciones de BSA de 0.5, 1 y 2.0% mostraron un descenso en el porcentaje de acrosomas dañados (19.05, 18.92 y 19.67%, respectivamente). Este comportamiento se mantuvo a los 120 minutos (37.17, 22.17, 21.83 y 22.33%, para 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0%, respectivamente).

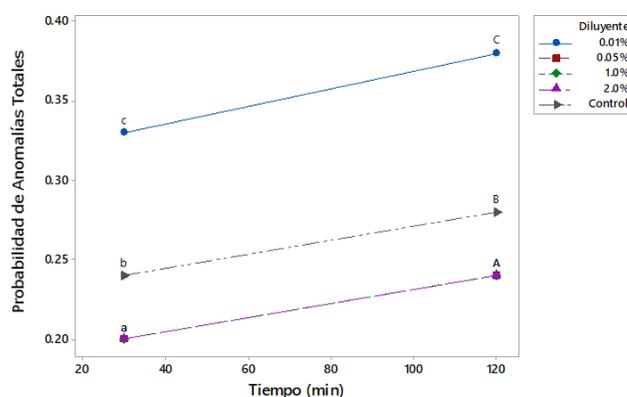


**Figura 9.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de acrosomas dañados del semen caprino congelado-descongelado, a los 30 minutos de incubación.



**Figura 10.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de acrosomas dañados del semen caprino congelado-descongelado, a los 120 minutos de incubación.

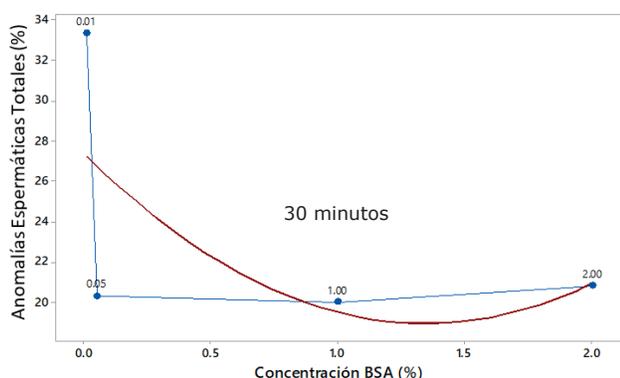
La probabilidad de anomalías espermáticas totales post descongelación entre los diluyentes a base de BSA en sus cuatro diferentes concentraciones y el DC durante el test de incubación se presenta en la Figura 11. A los 30 minutos, la menor probabilidad de anomalías espermáticas totales corresponde a las concentraciones de BSA de 0.5, 1.0 y 2.0%, no hubo diferencia entre ellas ( $p > 0.05$ ), el tratamiento control tuvo mayor probabilidad de anomalías totales ( $p < 0.05$ ) aunque inferior a la probabilidad que presentó la concentración de BSA al 0.1%. Este comportamiento para las concentraciones de BSA a los 30 minutos, se repitió a los 120 minutos.



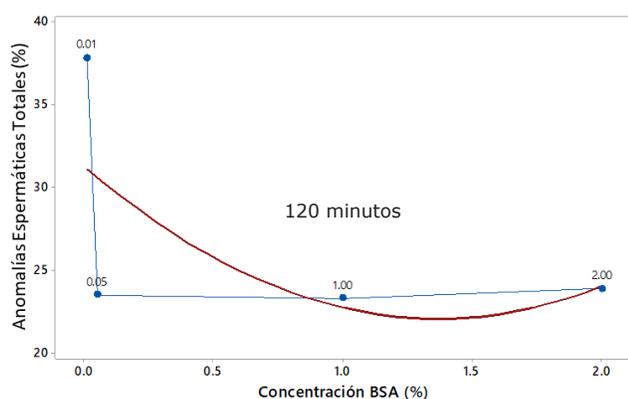
Letras diferentes dentro de cada tiempo indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

**Figura 11.** Efecto de la concentración de BSA y DC sobre la probabilidad de anomalías espermáticas totales durante el test de incubación.

En las figuras 12 y 13 se muestra el comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de anomalías espermáticas totales durante el test de incubación a los 30 y 120 minutos, respectivamente. A los 30 minutos, se observa que D1 (0.1% BSA) presentó el mayor porcentaje de anomalías espermáticas totales (33.33%), las concentraciones de BSA de 0.5, 1 y 2.0% mostraron un descenso en el porcentaje de anomalías totales (20.33, 20.0 y 20.83%, respectivamente). Este comportamiento se mantuvo a los 120 minutos (37.87, 23.5, 23.33 y 23.92%, para 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0%, respectivamente).



**Figura 12.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de anomalías espermáticas totales del semen caprino congelado-descongelado, a los 30 minutos de incubación.



**Figura 13.** Comportamiento de la concentración de BSA sobre el porcentaje de anomalías espermáticas totales del semen caprino congelado-descongelado, a los 120 minutos de incubación.

Al observar el comportamiento de la motilidad, viabilidad, acrosomas dañados y anomalías espermáticas totales post descongelación entre los diluyo-conservadores con BSA, en sus cuatro diferentes concentraciones, 0.1% (D1), 0.5% (D2), 1% (D3) y 2% (D4), podemos constatar que la menor probabilidad ( $p \leq 0.05$ ) de motilidad y viabilidad espermática que coincide con la mayor probabilidad de acrosomas dañados y anomalías totales ( $p \leq 0.05$ ), se observan con el D1, que se corresponde con la menor concentración de BSA (0.1%), al parecer este nivel es insuficiente para proteger la membrana espermática contra el choque frío, la congelación y la descongelación (10). Sin embargo, en la medida que se incrementó la concentración en 0.5, 1 y 2% (D2, D3 y D4), se observó una mayor probabilidad para la

motilidad y viabilidad y una menor probabilidad de acrosomas dañados y anomalías totales, resultados que se mantuvieron durante todo el test de incubación.

El DC, compuesto por Leche Descremada, Lactosa, DMSO y Glicerol, donde se realizó el lavado seminal por centrifugación; fue estadísticamente igual al D1 mostrando la menor probabilidad de motilidad y viabilidad espermática, así como mayor probabilidad de acrosomas dañados y anomalías totales ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Resultados similares a los encontrados respecto al uso de BSA sobre la motilidad y viabilidad espermática, fueron reportados por otros autores (7), quienes sugieren el uso de la BSA como componente del diluyo-conservador, por su perfil de aminoácidos y funciones protectoras, estos autores, al igual que en nuestro estudio, observaron los mejores resultados de motilidad y viabilidad espermática y mayor integridad de la membrana, con una concentración de 0.5%, estos valores disminuyen cuando utilizan concentraciones inferiores (0.25%), según estos mismos autores, un indicador del efecto protector de la BSA contra el choque frío, la congelación y la descongelación lo constituye el análisis de la calidad del esperma durante el test de incubación determinado por la motilidad y viabilidad espermática.

Otros estudios (9), con diferentes concentraciones de BSA (0, 0.1, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6%) en el diluyo-conservador, observaron que la concentración de 0.8% fue superior al resto de las utilizadas; estos autores plantean que niveles muy bajos, son insuficientes y daría como resultado el agotamiento temprano de la fuente de energía disponible para el metabolismo celular de los espermatozoides y que niveles muy elevados, tienden a crear una condición hiperosmótica extrema, lo cual ejerce presión sobre la membrana de los espermatozoides, pudiendo ocurrir fracturas o rupturas con la consiguiente muerte celular.

Concentraciones superiores de BSA fueron utilizados por otros autores (11), quienes probaron concentraciones de BSA de 5, 7.5 y 10%, en la congelación del semen caprino y observaron los resultados más bajos para

motilidad espermática, en la medida que las concentraciones fueron más elevadas (35.0, 30.8 y 28.8% respectivamente), este comportamiento también se observó para la integridad de la membrana (38.8, 34.6 y 33.4%), con diferencias significativas entre los tres tratamientos y en ambos parámetros.

La combinación de crioprotectores penetrantes y no penetrantes del DC, se sugiere para lograr mejor congelabilidad; el Glicerol y el DMSO, son crioprotectores penetrantes, de bajo peso molecular que inducen deshidratación (12).

La Lactosa, es un azúcar de alto peso molecular, que no puede difundirse a través de la membrana plasmática, e igualmente induce la deshidratación celular y por tanto en ambos casos, disminuye la probabilidad de formación de hielo intracelular, favoreciendo la supervivencia espermática a la crio preservación (3,13).

La Leche descremada actúa como protector de membrana contra el choque frío, forma una película protectora en la superficie del esperma y reemplaza los fosfolípidos de la membrana espermática que se pierden o dañan durante el proceso de crio preservación (14) al tiempo que mantienen la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides no solo durante el choque frío del período de equilibrio, sino también en la congelación y descongelación (15). Sin embargo, el lavado seminal por centrifugación reduce la motilidad del esperma, aumenta las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el stress oxidativo, así como los defectos morfológicos post descongelación (6,16,17,18).

Algunos autores coinciden con nuestro criterio de no eliminar el plasma seminal, su presencia es beneficiosa si se asocia al componente adecuado y en la proporción correcta (19,20), contiene gran cantidad de enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutasa, Catalasa), que regulan la sobreproducción de ROS durante el descenso de la temperatura y la congelación (21,22), además, a través de sus enzimas antioxidantes protege la estructura de la célula espermática y previene el aumento de anomalías derivadas del proceso de crio conservación (23).

En este experimento, los resultados evidencian la superioridad de la formulación que contiene Tris-Glucosa-Ácido Cítrico-Glicerol y BSA, donde cada elemento cumple una función específica y se demuestra que la composición del diluyo-conservador, es importante, y determina la calidad

del semen después de la descongelación. El Tris constituye el componente tampón más ampliamente usado en la congelación del semen caprino (17,24), y combinado con Ácido Cítrico proporciona el mejor sistema buffer para los diluyentes de esta especie (25), donde se ha observado mayor motilidad progresiva (44%) y mayor porcentaje de espermatozoides vivos (49%) comparado con otros buffers BES, TES y MES (3).

Los azúcares juegan un papel fundamental en la respiración de los espermatozoides, proporcionan equilibrio osmótico y crio protección en los diluyentes, la Glucosa es un sustrato excelente en el metabolismo del semen caprino y es esencial proporcionando la energía para que los espermatozoides puedan funcionar de manera fisiológica, además por su bajo peso molecular puede atravesar la membrana plasmática del espermatozoide (1) y actúa además como un crio protector penetrante, minimizando la formación de hielo intracelular lo que conduce a una mayor viabilidad después de la crio preservación (26,27).

El Glicerol es el crio protector penetrante más utilizado en el caprino (28), cuando ingresa al interior de la célula espermática, se une a la molécula de agua, provoca un estado de gel y produce un descenso en el punto de congelación lo que evita la formación de hielo intracelular, además favorece el reordenamiento de lípidos y proteínas de la membrana, lo que aumenta su fluidez, favorece la deshidratación a temperaturas más bajas, y provee una mayor capacidad para sobrevivir a la crio preservación (29).

La BSA es una lipoproteína de baja densidad soluble en agua, actúa como un crio protector no penetrante, se adhiere a la membrana del esperma y realiza su efecto interactuando con ella (11), la protege no solo contra el choque frío donde mantiene su permeabilidad selectiva e integridad funcional, sino también durante la congelación y descongelación evitando los agrietamientos y rupturas que se producen a consecuencia de este proceso (10,30). Contiene, además, grandes cantidades de ácidos grasos, que, a través de la Glucólisis, son utilizados para producir una mayor cantidad de energía y más duradera que la obtenida de la glucosa, por lo tanto, el suministro exógeno de BSA mejora la tasa de supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación y además una de sus funciones más importantes es la eliminación de ROS que se producen a consecuencia del estrés oxidativo (11).

En este estudio, todos los diluyos-conservadores que contienen BSA en sus cuatro diferentes concentraciones tienen en común, la presencia del plasma seminal y la composición (Tris, Ácido Cítrico, Glucosa y Glicerol); por lo tanto, las diferencias en cuanto a porcentajes de motilidad, viabilidad, acrosomas dañados y anomalías totales observadas en el semen descongelado, está determinada por la concentración de BSA utilizada.

En conclusión, en el proceso de crío conservación del semen caprino, no es preciso realizar el lavado seminal por centrifugación si se utiliza

como protector de membrana la BSA al 0.5% en un diluyo-conservador liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico y Glicerol.

### Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

### Agradecimientos

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

## REFERENCIAS

- Sharma A, Sood P. Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. *Vet Sci Res Rev.* 2020; 6(1):46-57. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.vsr/2020/6.1.46.57>
- Santiago-Moreno J, Galarza DA. Sperm cryopreservation in domestic and wild species: a review of recent advances. *Rev Ec Ciencia An.* 2019; 3(2):18-38. <http://www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116>
- Gangwar C, Kharche SD, Kumar S, Jindal SK. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. *Indian J. Small Ruminants.* 2016; 22(1):1-10. <http://dx.doi.org/10.5958/0973-9718.2016.00005.2>
- Umar S, Ahmad M, Ahmad I, Zubair M, Umar Z, Qureshi AS, Manzoor A, Murtaza A, Shaukat A. Correlation of biochemical constituents of seminal plasma with semen quality in Teddy goat (*Capra hircus*) bucks. *Andrología.* 2018; 50(3):e12940. <https://doi.org/10.1111/and.12940>
- Ritar AJ, Salamon S. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust J Biol Sci.* 1982; 35:305-312. <https://www.publish.csiro.au/bi/pdf/BI9820305>
- Fathi M, Zaher R, Ragab D, Gamal I, Mohamed A, El Naga EA, et al. Soybean lecithin-based extender improves Damascus goat sperm cryopreservation and fertilizing potential following artificial insemination. *Asian Pac J Reprod.* 2019; 8(4):174-180. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.262834>
- Alcay S, Toker MB, Gokce E, Onder NT, Ustuner B, Nur Z. Long term incubation resilience of post-thaw ram semen diluted with lecithin-based extender supplemented with Bovine Serum Albumin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2019; 25(3):291-297. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20843>
- Sandal AI, Senlikci H, Baran A, Ozdas OB. Effects of semen extender supplemented with Bovine Serum Albumin (BSA) on spermatological traits of Saanen buck semen stored at +4°C. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2020; 26(4):515-520. [https://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf\\_KVFD\\_L\\_2696.pdf](https://vetdergikafkas.org/uploads/pdf/pdf_KVFD_L_2696.pdf)
- Software Statistical Minitab 19. State College, PA: Minitab, Inc. 2019.
- Osman CF, Nang SF, Ibrahim SB, Budin FHF, Jaffar NAA. Albumin improved spermatozoa quality and DNA integrity for freezing-free preservation. *Int J Biol Med Res.* 2012; 3(2):1670-1679. <https://citeseeerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.588.7002&rep=rep1&type=pdf>

11. Mahdi SAAW, Mahmood FA, Mahmoo RM. Effect of different concentrations of Bovine Serum Albumin on some of the frozen sperm characteristics of the rams. *Plant Archives*. 2019; 19(2):1486-1488. [http://plantarchives.org/SPL%20ISSUE%20SUPP%202,2019/259%20\(1486-1488\).pdf](http://plantarchives.org/SPL%20ISSUE%20SUPP%202,2019/259%20(1486-1488).pdf)
12. ElliottGD, WangS, FullerBJ. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *J Cryobiol*. 2017; 70:74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
13. Raju R, Bryant SJ, Wilkinson BL, Bryant G. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021; 1865:129749. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129749>
14. Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod*. 2012; 9(4):809-815. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6053f7783717068b46cc/pdf/animreprod-9-4-809.pdf>
15. Pini T, Leahy T, de Graaf SP. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology*. 2018; 118:172-181. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.006>
16. Daramola JO. Effect of centrifugation on motility, sperm capacitation and acrosome reaction in soy bean and avocado seed milk extenders of cryopreserved goat spermatozoa. *Agricultura Tropica Subtropica*. 2017; 50(1):13-18. <https://doi.org/10.1515/ats-2017-0002>
17. Gojen L, Ray K, Sarkar B. Effect of different levels of egg yolk on cryopreservation of Black Bengal buck semen in Tris egg yolk citrate fructose glycerol extender. *Iranian J of Applied Anim Sci*. 2016; 6(1):101-106. [http://ijas.iaurasht.ac.ir/article\\_520885.html](http://ijas.iaurasht.ac.ir/article_520885.html)
18. Tabarez A, Garcia W, Palomo MJ. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*. 2017; 149:91-98. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.007>
19. Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, et al. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front Vet Sci*. 2019; 6:268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
20. Nethenzheni LP, Mphaphathi ML, Madzhie LR, Negota NC, Kalonji PVM, Nedambale TL, et al. Effect of Bioxcell® and Triladyl® extenders and removal of seminal plasma on equilibrated and cryopreserved semen from South African unimproved indigenous bucks. *J Bacteriol Mycol*. 2021; 8(1):1164 <https://austinpublishinggroup.com/bacteriology/fulltext/bacteriology-v8-id1164.pdf>
21. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*. 2015; 21(2):209-227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
22. Zamiri MJ. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *J. Livest. Sci. Technol*. 2020; 8(1):1-15. <https://doi.org/10.22103/jlst.2020.15927.1321>
23. Baghel G, Anand M, Yadav S. Evaluate the effect of egg yolk and seminal plasma on spermatozoa abnormality using different cryopreservation protocol in Barbari buck semen. *International J. Sci. Environ. Technol*. 2016; 5(2):666-671. <https://www.ijset.net/journal/916.pdf>
24. Tariq M, Khan MS, Shah MG, Nisha AR, Umer M, Hasan SM, et al. Exogenous antioxidants inclusion during semen cryopreservation of farm animals. *J Chem Pharm Res*. 2015; 7(3):2273-2280.
25. Sharma A, Sood P, Chaudhary JK. Correlation of climatic conditions with seminal quality parameters in Gaddi and Chegu buck semen. *Asi J Anim Vet Adv*. 2020; 15:32-37. <https://doi.org/10.3923/ajava.2020.32.37>
26. Yodmingkwan P, Guntaprom S, Jaksamrit J, Lertchunhakiat K. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agric Agric Sci Procedia*. 2016; 11:125-130. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.021>

27. Narwade BM, Mohanty TK, Bhakat M, Rahim A. Goat semen cryopreservation using egg yolk and soya based extenders containing trehalose. *India J Anim Sci.* 2017; 87(7):851-855.
28. Sharma A, Sood P, Chaudhary JK. Effect of different concentrations of glycerol in cryopreservation of Gaddi goat semen. *J Vet Andr.* 2020; 5(1):1-6 [http://cesica.org/publicaciones/index.php/journal\\_veterinary\\_andrology/article/view/85/71](http://cesica.org/publicaciones/index.php/journal_veterinary_andrology/article/view/85/71)
29. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches *Boimed.* 2018; 37(3):327-339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
30. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno.* 2007; 76:383-390. <https://doi.org/10.2754/avb200776030383>