

Efecto del protector de membrana y la solución descongelante en la calidad *in vitro* del semen caprino congelado en pastillas



<https://cu-id.com/2248/v44e09>

Effect of membrane protector and thawing solution on the *in vitro* quality of frozen goat semen in pellets

✉ Josefa Amada Martínez Durán^{1*}, ✉ Omar Duverger Tellez¹, ✉ Namibia Díaz Martínez¹, ✉ Lisbany Interian Alvarez¹, ✉ Ramón Denis García¹, ✉ Zahilys López Abreu¹, ✉ Mara Dunia Quintana Utra², ✉ Alejandro Palacios Espinosa³

¹Departamento de Genética y Biotecnología. Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical (CIMAGT), Avenida 101 e/100 y 62 No. 6214 Loma de Tierra, Cotorro, La Habana, Cuba.

E-mail: o.duverger39@gmail.com, namibia011977@gmail.com, interian1983@gmail.com, denisrg64@yahoo.es, zlopezabreu@gmail.com

²Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria de la Habana. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional Km 23½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. E-mail: mdutra@unah.edu.cu

³Departamento de Ciencia Animal y Conservación del Hábitat. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Km. 5.5 carretera al Sur, Colonia El Mezquitito. C.P. 23080. La Paz, B.C.S., México. E-mail: palacios@uabcs.mx

RESUMEN: Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del protector de membrana y la solución descongelante en la calidad *in vitro* del semen caprino congelado en pastillas. Se procesaron 214 eyaculados, colectados dos veces por semana mediante Vagina Artificial. Se evaluaron los parámetros volumen, motilidad, concentración, viabilidad y anomalías espermáticas totales. Los eyaculados aptos fueron mezclados y divididos en dos porciones; cada una recibió la formulación correspondiente sin realizar el lavado seminal por centrifugación. Se utilizó un diluyoconservador liofilizado no comercial compuesto por Tris-Glucosa-Ácido Cítrico y Glicerol, con diferentes protectores de membrana, yema de huevo (4,45%) o BSA (5%). Se congeló en vapores de nitrógeno, en pastillas de 0,1 mL y se almacenaron en nitrógeno líquido durante siete días. Para la descongelación, se utilizaron dos soluciones (Tris y CIMATO) y un control (tubo seco sin solución descongelante). Se determinó en test de incubación, porcentaje de motilidad (30, 120 y 240 minutos), viabilidad y acrosomas dañados (30 y 120 minutos). El protector de membrana, la solución descongelante y sus interacciones se compararon mediante un modelo de Regresión Logística Binaria. La combinación de BSA y el CIMATO presentaron la mayor probabilidad ($P < 0,05$) de motilidad y viabilidad en todos los tiempos y la menor probabilidad ($P < 0,05$) de acrosomas dañados a 30 min y 120 min. Se concluye que la BSA puede utilizarse como protector de membrana, para la congelación del semen caprino en pastillas en un diluyoconservador liofilizado a base de Tris, sin realizar el lavado seminal por centrifugación y la solución CIMATO, como descongelante, posibilita mejor recuperación de la célula espermática.

Palabras clave: Semen caprino, plasma seminal, protector de membrana, congelación, descongelación.

ABSTRACT: The aim of this research was to evaluate the effect of membrane protector and thawing solution on the *in vitro* quality of goat semen frozen in pellets. Two hundred and fourteen ejaculates, collected twice a week by artificial vagina, were processed. The parameters volume, motility, concentration, viability, and total sperm abnormalities were evaluated. Suitable ejaculates were mixed and divided into two portions. Each received the corresponding formulation without carrying out the sperm washing by centrifugation. A non-commercial freeze-dried diluent composed of Tris-Glucose-Citric Acid and Glycerol, with different membrane protectors, egg yolk (4.45%) or BSA (5%), was used. It was frozen in vapor phase nitrogen (0.1 mL pellets), stored in liquid nitrogen for seven days. For thawing, two solutions (Tris and CIMATE) and a control (dry tube without thawing solution) were used. Percent motility (30, 120 and 240 minutes), viability and damaged acrosomes (30 and 120 minutes) were determined in incubation test. Membrane protector, thawing solution and their interactions were compared using a Binary Logistic Regression model. The combination of BSA and CIMATE presented the highest probability ($P < 0.05$) of motility and viability at all times and the lowest probability ($P < 0.05$) of damaged acrosomes at 30 min and 120 min. It is concluded that BSA can be used as a membrane protector for goat semen frozen in pellets in a freeze-dried Tris-based diluent, without carrying out sperm washing by centrifugation. In addition, CIMATO solution, as a thawing agent, enables better sperm cell recovery.

Key words: Goat semen, sperm plasma, membrane protector, freezing, thawing.

*Correspondencia a: Josefa Amada Martínez Durán. E-mail: fefamar63@gmail.com

Recibido: 22/08/2022

Aceptado: 20/09/2022

INTRODUCCIÓN

La criobiología nos permite entender los procesos que ocurren en la célula espermática al intentar prolongar su viabilidad y funcionalidad (1). Durante la congelación, el eyaculado está expuesto a una serie de daños físicos, químicos, mecánicos, osmóticos y oxidativos (2,3), que pueden afectar la estructura del espermatozoide y su funcionalidad (4).

Los daños que ocurren en las células espermáticas durante la congelación no derivan de la permanencia a bajas temperaturas, sino de los procesos de enfriamiento y calentamiento, los cuales inducen la disminución o pérdida de la función espermática que se refleja en la viabilidad y motilidad espermáticas, elementos esenciales para la fecundación (5).

Estos daños pueden minimizarse, si se conocen los cambios que ocurren no solo durante la congelación, sino también en el proceso de descongelación, que son similares, pero en reverso; es decir, que la célula sufre dos veces esta agresión (6). Por tal motivo, es preciso dotarla de los elementos necesarios para minimizar los sucesos que obligatoriamente van a ocurrir. El éxito radica en preservar la integridad de las membranas plasmática, mitocondrial y acrosómica, después de la descongelación, lo cual garantiza la capacidad para sobrevivir en el tracto genital femenino y fecundar (7,8,9).

También es preciso conocer las características seminales de la especie que se desea crioconservar (10). El caprino posee un elevado contenido de Fosfolipasa A en el plasma seminal, enzima que reacciona con la lecitina de la yema de huevo (YH) o con los lípidos residuales de la leche descremada (LD); ambos compuestos son de obligatoria inclusión en la composición del diluyoconservador seminal. La reacción enzimática que se produce origina sustancias tóxicas, que causan la coagulación del medio, la disminución de la motilidad, la inmovilización y muerte de la población espermática. Para eliminar estos efectos negativos del plasma seminal, se recomienda el lavado por centrifugación (11), utilizar bajos porcentajes de YH en el diluyoconservador (12) o utilizar Albúmina de Suero Bovino (BSA) como protector de membrana, en sustitución de la yema de huevo (13).

La descongelación también constituye un punto crítico y, si el proceso no se realiza adecuadamente, los espermatozoides pueden dañarse. Para el semen congelado en pastillas, mucho se ha discutido acerca de la necesidad de utilizar una solución descongelante (14,15) y la importancia de su composición química (16).

Teniendo en cuenta estos criterios, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del protector de membrana y la solución descongelante en la calidad *in vitro* del semen caprino congelado en pastillas, en un diluyoconservador liofilizado a base de Tris, sin realizar el lavado seminal por centrifugación.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Animales. Como donantes del esperma, se utilizaron sementales caprinos de las razas Saanen (2), Alpina (3) y Boer (6), con una edad entre tres a cinco años, estabulados, ubicados individualmente y con una alimentación a base de concentrado comercial (1 kg diario/animal) forraje King Grass (5 kg diario/animal dos veces al día), sales minerales y agua *ad libitum*.

Colección y evaluación del semen. Se procesaron 214 eyaculados en 20 réplicas; la extracción del semen se realizó dos veces por semana mediante Vagina Artificial, siempre en presencia de una hembra en celo; inmediatamente después, se determinaron los parámetros seminales volumen (mL) mediante colector graduado, motilidad (%) por valoración al microscopio con un aumento de 40x, concentración espermática ($\times 10^6/\text{mL}$) mediante conteo en cámara de Neubauer, viabilidad (% de vivos) por tinción con eosina-nigrosina y anomalías espermáticas totales (%), utilizando un microscopio de contraste de fase. Todos los eyaculados aptos para ser procesados (volumen $\geq 0,5\text{mL}$; motilidad $\geq 80\%$; concentración espermática $\geq 3000 \times 10^6/\text{mL}$; viabilidad $\geq 80\%$ y anomalías totales $\leq 20\%$), se mezclaron y se dividieron en dos porciones.

Diluyoconservadores. Se utilizó un diluyoconservador liofilizado no comercial, compuesto por Tris (4,4g), Ácido Cítrico (2,3g) y Glucosa (0,74g) en 100 mL de agua bidestilada, combinado con dos protectores de membrana, YH (4,45%) y BSA (0,5%); en ambas combinaciones se utilizó como antimicrobianos, penicilina con estreptomycin (1000 UI/mL-1 mg/mL, respectivamente). 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 Glicerol al 6% (v/v).

Dilución del semen. Cada porción de eyaculado procedente del pool recibió el diluyoconservador correspondiente a una temperatura de 37°C, según los cálculos de dilución, sin realizar lavado seminal y en un solo paso. La concentración espermática 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 periodo de equilibrio.

Periodo 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 dos 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 este. Al transcurrir dos minutos, las pastillas de semen congeladas se depositaron en viales plásticos previamente identificados (código del semental, fecha de congelación, especie, medio de congelación, # de dosis) y se depositaron en un termo con nitrógeno líquido (-196°C) donde permanecieron hasta su descongelación.

Descongelación. Se utilizaron dos soluciones, **Tris** compuesta por Tris-Glucosa-Ácido Cítrico (TGC) y **CIMATO** (Citrato de Sodio y Bromuro de Potasio) y un **Control** (tubo seco sin solución descongelante). En un baño María con control de temperatura, se depositó una pastilla de cada muestra congelada en un tubo de ensayo con 1mL de solución descongelante a 37°C, que se agitó hasta su descongelación.

Evaluación del semen descongelado (Prueba 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) y porcentaje de acrosomas dañados (roto o inexistente) 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.

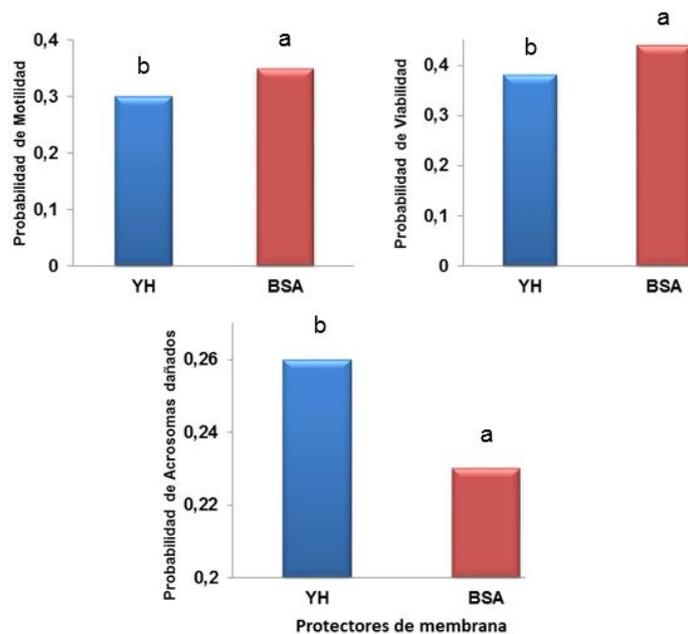
Análisis estadístico. Para el análisis estadístico, se utilizó un modelo de Regresión Logística Binaria del Software estadístico Minitab 19 (17), con el objetivo de determinar el efecto del protector de membrana, la solución descongelante y el tiempo, así como sus interacciones sobre la motilidad, viabilidad y acrosomas dañados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) en todos los parámetros seminales evaluados posdescongelación a favor del diluyoconservador compuesto por Tris-Glucosa-Ácido Cítrico-Glicerol y BSA como protector de membrana, comparado con el diluyoconservador compuesto por Tris-glucosa-ácido cítrico-glicerol y YH como protector de membrana (Fig. 1).

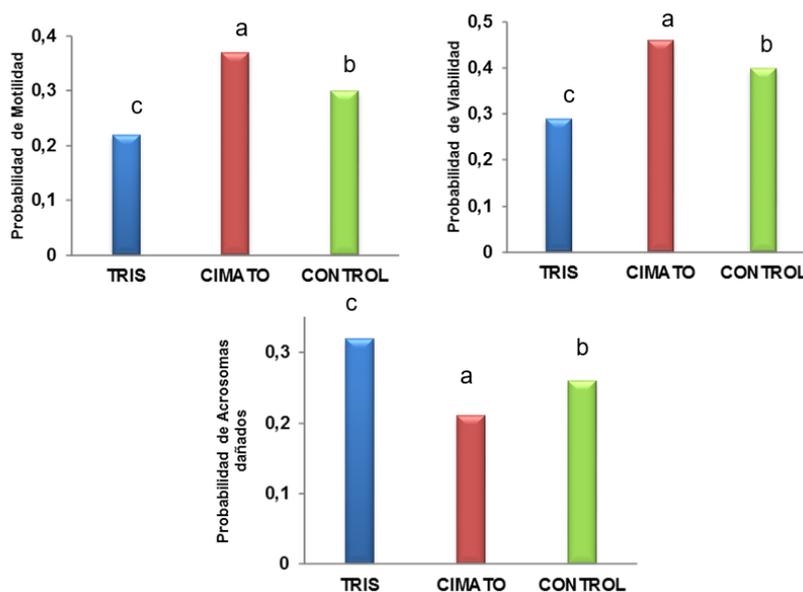
La probabilidad de motilidad para la BSA fue superior ($P \leq 0,05$) a la obtenida con la YH (0,35 vs 0,3 respectivamente). Se observó igual tendencia de respuesta para la probabilidad de viabilidad, pues fue igualmente superior ($P \leq 0,05$) para BSA (0,44) comparada con YH (0,38). El mejor resultado para la probabilidad de acrosomas dañados se observó para la BSA (0,23), quien mostró la menor probabilidad ($P \leq 0,05$) comparada con la YH (0,26).

En todos los indicadores evaluados se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre todos los descongelantes, a favor del CIMATO (Fig. 2). El CIMATO mostró la mayor probabilidad ($P \leq 0,05$) de motilidad (0,37) y viabilidad espermiática (0,46) y la probabilidad más baja ($P \leq 0,05$) para acrosomas dañados (0,21). Con el descongelante Tris se observó el resultado de menor motilidad y viabilidad (0,22 vs 0,29 respectivamente), así como la probabilidad más elevada (0,32) de acrosomas dañados ($P \leq 0,05$).



Letras desiguales en el protector de membrana de cada parámetro evaluado, indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$).

Figura 1. Efecto del protector de membrana en la probabilidad de motilidad, viabilidad y acrosomas dañados del semen caprino congelado en pastillas. / Effect of membrane protector with respect to motility, viability and damaged acrosomes of goat semen frozen in pellets.



Letras desiguales en la solución descongelante de cada parámetro evaluado, indican diferencia significativa ($P < 0,05$)

Figura 2. Efecto de la solución descongelante en la probabilidad de motilidad, viabilidad y acrosomas dañados del semen caprino congelado en pastillas. / *Effect of thawing solution with respect to motility, viability and damaged acrosomes of goat semen frozen in pellets.*

Se observó una interacción significativa ($P \leq 0,05$) entre la solución descongelante, el protector de membrana y el tiempo, para la motilidad, viabilidad y acrosomas dañados del semen caprino congelado en un diluyoconservador liofilizado, a base de TGC (Fig. 3).

Para la motilidad espermática, todos los descongelantes evaluados y comparados entre sí resultaron estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) durante la prueba de incubación; el mejor resultado (mayor probabilidad de motilidad espermática) se observó para CIMATO, que fue diferente dentro de cada protector de membrana y mayor para la BSA ($P \leq 0,05$). Este comportamiento también se observó para el Control y Tris, los que a su vez resultaron estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre sí. Con el descongelante Tris, se observó la menor probabilidad de motilidad espermática para ambos protectores de membrana (YH y BSA) y en los tres tiempos analizados (30, 120 y 240 minutos).

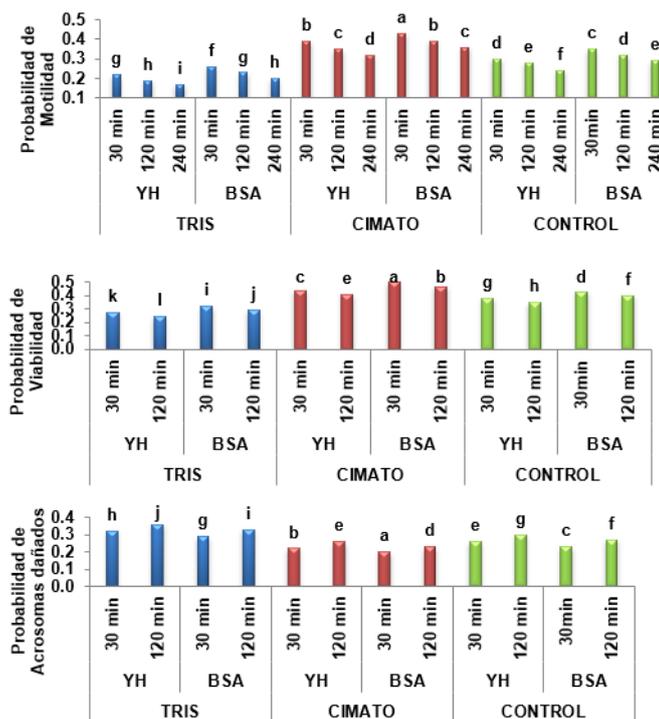
Respecto a la viabilidad espermática, todos los descongelantes evaluados resultaron estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre sí, a los 30 y 120 minutos; la mayor probabilidad de viabilidad espermática se observó para CIMATO, que fue diferente dentro de cada protector de membrana y mayor para la BSA ($P \leq 0,05$); este comportamiento también se presentó para el Control y Tris, que a su vez resultaron estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre sí, aunque Tris presentó la menor probabilidad de viabilidad espermática.

Con relación a los acrosomas dañados, el mejor resultado se mostró con el descongelante CIMATO, que coincide con la menor probabilidad ($P \leq 0,05$) comparado con Tris y Control, quienes, a su vez, resultaron estadísticamente diferentes entre sí ($P \leq 0,05$); aunque, con Tris, se presentaron los valores más elevados de acrosomas dañados para ambos protectores de mem-

brana (YH y BSA) y en ambos tiempos (30 y 120 minutos). Con la BSA, siempre se observó el menor valor, comparado con la YH ($P \leq 0,05$) con todos los descongelantes y en cada tiempo analizado.

En esta investigación, se observó un mejor resultado en todos los parámetros seminales evaluados poscongelación (motilidad, viabilidad y acrosomas dañados) cuando se utilizó, como protector de membrana, la BSA en comparación con la YH. De igual manera, algunos autores (13) señalan un mejor resultado para los parámetros seminales motilidad, viabilidad y morfología, en un diluyoconservador compuesto por TGC-BSA comparado con TGC-YH. Estos autores proponen el uso de la BSA para sustituir la YH en los diluyoconservadores a base de TGC, lo cual evitaría la reacción enzimática entre la Fosfolipasa A presente en el plasma seminal y la Lecitina de la YH, la cual genera ácidos grasos y lisolecitina, sustancias nocivas para los espermatozoides que disminuyen la motilidad y reducen las tasas de supervivencia posdescongelación.

La composición del diluyoconservador influye en los resultados de la criopreservación (18,19). En esta investigación se utilizaron dos formulaciones con características comunes; por ejemplo, en ambas están presentes los componentes del plasma seminal, pues no se realizó el lavado por centrifugación, cuentan con la misma proporción de Tris y Ácido Cítrico como controladores del pH del medio (20), Glucosa como fuente de energía y crioprotector interno (11) y Glicerol como crioprotector (3); por tanto, la diferencia significativa ($P \leq 0,05$) en los resultados de motilidad, viabilidad y daño acrosomal que se observa en la Figura 1, y que se mantienen durante todo el tiempo en la prueba de incubación (Figura 3), pudiera estar condicionada al protector de membrana utilizado (YH o BSA).



Letras desiguales por columna en cada parámetro seminal evaluado, indica diferencia significativa ($P < 0,05$).

Figura 3. Efecto de la interacción entre la solución descongelante, el protector de membrana y el tiempo, en la probabilidad de motilidad, viabilidad y acrosomas dañados del semen caprino congelado en pastillas. / *Effect of interaction between thawing solution, membrane protector and time with respect to motility, viability and damaged acrosomes of goat semen frozen in pellets.*

Los protectores de membrana actúan fundamentalmente durante el periodo de equilibrio, enmarcado después de la dilución y antes de la congelación, donde ocurre el descenso gradual de temperatura desde 37 a 5°C; su función es proteger la membrana espermática contra los daños irreversibles que se inician asociados a las bajas temperaturas (2, 3), donde se modifica la bicapa lipídica que cambia de estado líquido a gel, y ocasiona daños en la membrana externa, que aumenta su permeabilidad y ocurre la apertura de poros, lo cual origina la salida de proteínas (21).

El mecanismo protector de la YH se atribuye a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), quienes inmediatamente después de la dilución, comienzan a secuestrar las proteínas aglutinantes de esperma (BSP) del plasma seminal, disminuyendo la cantidad de proteínas disponible para unirse a la membrana espermática y, por tanto, se minimiza el efecto nocivo que estas causan por la salida del colesterol y fosfolípidos de la membrana (18). Además, los lípidos presentes en las LDL forman una barrera que protege la membrana contra el choque frío y reemplazan los fosfolípidos de la membrana que se pierden continuamente durante el proceso de congelación-descongelación; el mecanismo de protección de los espermatozoides por la YH implica una interacción proteínas BSP: lipoproteína de la YH (9).

En esta investigación, cuando se utilizó en el diluoyconservador la YH como protector de membrana,

la reacción enzimática se produjo porque ambos elementos están presentes (Fosfolipasa A y Lecitina), aunque según investigaciones recientes de este colectivo de autores (12), a escala mínima, debido a la baja concentración de YH (4,45%) que es suficiente para garantizar la protección contra el choque frío sin que se produzcan daños significativos en la población espermática asociados a la reacción enzimática.

Por su parte, la BSA es una lipoproteína de baja densidad soluble en agua, que actúa como un crioprotector no penetrante (22), se adhiere a la membrana del espermatozoide y la protege contra el choque frío donde mantiene su permeabilidad selectiva e integridad funcional, así como durante la congelación y descongelación, para evitar los agrietamientos y rupturas que se producen a consecuencia de este proceso (23,24).

Se conoce que contiene grandes cantidades de ácidos grasos, los cuales, a través de la glucólisis, se utilizan para producir una mayor cantidad de energía y más duradera que la obtenida de la glucosa. Por lo tanto, la inclusión de BSA mejora la tasa de supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación; además, una de sus funciones más importantes es la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen a consecuencia del estrés oxidativo durante el enfriamiento, la congelación y la descongelación (22).

Cuando se utilizó la BSA como protector de membrana, se observó un efecto positivo en la motilidad y

la viabilidad, e igualmente el daño acrosomal posdescongelación es menor. Algunos autores señalan que su estructura proteica le confiere propiedades crioprotectoras, como prolongación de las que ya posee contra el choque frío que ocurre durante el periodo de equilibrio (13), y sugieren emplearla como un sustituto de la YH, que en el caso del caprino es beneficioso porque se evita la conocida reacción enzimática que se produce entre la Fosfolipasa A del plasma seminal y los protectores de membrana convencionales (YH y LD).

La crioconservación espermática es un proceso complejo y su mayor desafío es cruzar la zona de temperatura intermedia entre -15°C y -60°C , donde los espermatozoides deben pasar dos veces por estas temperaturas, primero durante la congelación y luego durante la descongelación (25). Algunos autores señalan que las lesiones en los espermatozoides durante la crioconservación convencional está más relacionada con el efecto negativo de la descongelación (26).

En el caso de las pastillas, existen diferentes criterios sobre la necesidad o no de utilizar soluciones descongelantes para minimizar el daño asociado a la descongelación y garantizar la mayor recuperación de las células crioconservadas (27).

En este sentido, para descongelar el semen caprino congelado en pastillas, algunos autores(28,29) recomiendan utilizar una solución cuya composición sea similar al medio de congelación, pero sin la presencia del protector de membrana ni el crioprotector; sin embargo, en la presente investigación, cuando se utilizó el descongelante Tris(Solución de TGC) los valores fueron los más bajos.

De igual manera, otros autores (30) utilizaron una solución de TGC para la descongelación de pastillas de semen caprino y observaron inferiores resultados de motilidad espermática, incluso cuando compararon con el semen descongelado en tubo seco sin solución descongelante.

La combinación TGC es excelente como diluyoconservador (20); pero si se utiliza como solución descongelante, por su ligera hipertonicidad, puede ocasionar un stress osmótico, el cual, al ser mantenido durante la prueba de incubación, conduciría a la deshidratación celular; a medida que la célula pierde volumen por la salida del agua, la compresión del contenido citoplasmático es mayor, aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen y, al excederse la resistencia física de la membrana, se pueden producir lesiones irreversibles en su permeabilidad y pérdida de lípidos, lo cual afectará su integridad con los consiguientes daños estructurales y funcionales. Esto reduce la motilidad y viabilidad de los espermatozoides congelados (31,10, 6).

Existe también el criterio de que las pastillas deben descongelarse en un tubo seco a 37°C (8,14). En esta investigación, dicho procedimiento se utilizó como Control para comprobar si realmente el uso de

solución descongelante tenía influencia en los parámetros seminales posdescongelación. Los valores de los parámetros seminales alcanzados con el descongelante CIMATO evidencian los resultados más elevados de motilidad y viabilidad, así como el menor daño acrosomal durante toda la prueba de incubación; al parecer, esta solución proporciona un ambiente más estable que Tris y Control, lo que nos hace pensar que la composición de la solución descongelante es importante en la recuperación y supervivencia de las células espermáticas posdescongelación.

Los resultados alcanzados en este estudio para la solución descongelante CIMATO, podrían estar dados por el efecto que sus componentes (Citrato de Sodio y Bromuro de Potasio) ejercen en el semen descongelado. El Citrato de Sodio regula y mantiene el pH en el medio y actúa, además, como un agente antioxidante (32) contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por los espermatozoides muertos y moribundos, además de las que se generan del propio metabolismo espermático de los vivos. Por su parte, el Bromuro de potasio contribuye a mantener el balance osmótico y el pH del medio, a la vez que se comporta como una sal activante (33).

Otras investigaciones (34, 35) sugieren utilizar una solución de Citrato de Sodio al 2,9,% para la descongelación del semen caprino en pastillas, a fin de lograr mejor recuperación de las células espermáticas que no fueron dañadas durante el proceso de crioconservación.

El periodo de equilibrio, la congelación y la descongelación provocan cambios de temperatura que afectan la integridad estructural y funcional de la membrana espermática. Estos daños pueden minimizarse con un diluyoconservador cuyo diseño sea capaz de proteger a la célula espermática en cada uno de los periodos que, obligatoriamente, deben transitar en el proceso de criopreservación (20) a fin de garantizar, después de la descongelación, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides, parámetros importantes que influyen directamente en la fertilidad (36).

CONCLUSIONES

La BSA puede utilizarse como protector de membrana en un diluyoconservador liofilizado a base de Tris-Glucosa-Ácido Cítrico y Glicerol, para la congelación del semen caprino en pastillas, sin realizar el lavado seminal por centrifugación. La solución CIMATO utilizada como descongelante posibilita mejor recuperación de la célula espermática.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CIMAGT por el apoyo en la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, Kjelland ME, Ferré LB. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reprod Domest. An.* 2019;54(4):655-665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
2. Ntemka A, Tsakmakidis IA, Kiossis E, Milovanović A, Boscos CM. Current status and advances in ram semen cryopreservation. *J Hellenic Vet Med Soc.* 2018;69(2):911-924. <https://ejournals.epublishing.ekt.gr/index.php/jhvms/article/view/18014>
3. Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, *et al.* Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(8):2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
4. Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-ased extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology.* 2020;92:146-150. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.12.004
5. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction,* 2020;159(4):189-201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
6. Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking.* 2019;17(6):603-612. <http://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
7. Karunakaran M, Devanathan TG. Evaluation of bull semen for fertility associated protein, in vitro characters and fertility. *J Appl Anim Res.* 2017;45:136-144. DOI: 10.1080/09712119.2015.1129343.
8. 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. ISSN 2602-8220.
9. Zamiri MJ. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *Journal of livestock science and technologies.* 2020;8(1):1-15. DOI: 10.22103/jlst.2020.15927.1321.
10. Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman SU, Khan MZ, *et al.* Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Front. Vet. Sci.* 2021;8:609180. DOI: 10.3389/fvets.2021.609180
11. Sharma A, Sood P. Cryopreservation and fertility of frozen thawed Chegu goat semen. *Indian J. Anim. Res.* 2019; 53(11): 1414-1419. DOI: 10.18805/ijar.B-3696
12. Martínez-Durán J, Duverger-Tellez O, Díaz-Martínez N, Interian-Alvarez L, Denis-García R, Palacios-Espinosa A. Effect of the sperm membrane protector on the freezability of goat semen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 2022;25(2). <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/4011>
13. 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. DOI: 10.9775/kvfd.2019.23674.
14. Sharma A, Sood P. Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. *Veterinary Sciences: Research and Reviews.* 2020;6(1):46-57. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.vsr/2020/6.1.46.57>
15. Satorre MM, Breininger E. Effect of packaging method on quality and functional parameters in cryopreserved porcine spermatozoa with alpha tocopherol. *Research in Veterinary Science and Medicin.* 2021;1(1):1-6. DOI: 10.25259/RVSM_4_2020.
16. Khalifa TAA, El-Saidy BE. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *An Reprod Sci.* 2006;93:303-315. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.08.008
17. Minitab 19. Software estadístico, State College, Pensilvania: Minitab, Inc. 2019. www.minitab.com
- 18.- An Objective Analysis of Factors Affecting Buck Semen Quality Attributes during Cryopreservation: A Mini Review. *Annual Research & Review in Biology,* 2018;27(3):1-7. DOI: 10.9734/ARRB/2018/42087
19. Raheja N, Choudhary S, Grewal S, Sharma N, Kumar N. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2018;6(3):239-245.
20. Gangwar C, Kharche SD, Kumar S, Jindal SK. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. *Indian Journal of Small Rum.* 2016;22(1):1-10. DOI: 10.5958/0973-9718.2016.00005.2
21. Silva ECB, Lima RA, Guerra MMP. Goat semen freezing: the two faces of the coin. *An. Sci.* 2021;31(1):134-144. http://www.uece.br/cienciaanimal/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=797&tmpl=component&format=raw&Itemid=157

22. 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):1486-488.
23. Alcaay 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>
24. 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>
25. Bustani GS, Baice FH. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders, *Veterinary World*. 2021;14(5):1220-1233.
DOI: doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233
26. Isachenko V, Sanchez R, Rahimi G, Mallmann P, Isachenko E, Merzenich M. Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa: Fish as a model of human. *Andrologia*. 2019;51(1):e13166.
<https://doi.org/10.1111/and.13166>
27. Fhulufhelo RV, Khoboso L, Tshimangadzo N. Cryopreservation of South African Indigenous Goat Semen. Alemania. Ed. Lambert Academic Publishing (LAP). 2012. ISBN 10: 3848442469 / ISBN 13: 9783848442461.
28. Evans G, Maxwell WMC. Frozen storage of semen. In: *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Wellington. 1987;122-141. ISBN: 9780409491777
29. Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K, Terada T. Enhanced Freezability of Goat Spermatozoa Collected into Tubes Containing Extender Supplemented with Bovine Serum Albumin (BSA). *J. Reprod. Dev*. 2006;52(3):407-414.
DOI: [10.1262/jrd.17105](https://doi.org/10.1262/jrd.17105).
30. Martínez J, Interián L, Valdés M, Milanés C, Collazo J. Influencia del protector de la membrana espermática, el crioprotector y la solución descongelante en la congelabilidad del semen caprino. *Rev. Cub. Reprod. Anim*. 2004;30(1-2):81-89.
31. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, *et al*. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(3):327-339.
DOI: [10.1016/j.rbmo.2018.05.012](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012)
32. Viotty G. Procesamiento del semen bovino para la Inseminación Artificial. Tesis Doctoral. Univ. Montevideo, Fac. Vet., Uruguay. 2012.
33. Duverger O, Moya A, Barba FJ, Hernández JJ. Nuevos diluyentes y descongelantes para semen bovino. *Rev. Cub. Cient. Vet*. 1988;19(1):19-28.
34. Awad MM, Graham JK. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. *Animal Reproduction Science*. 2004;84:83-92.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.001>
35. Moraes C, Neves J, Goncalves P, Oliveira J, Schweitzer C. Criopreservacao do semen ovino en pellets. *Ciencia Rural*. 1998;28(2):287-292.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84781998000200018>
36. Saadeldin IM, Khalil WA, Alharbi MG, Lee SH. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. *Animals*. 2020;10(12):2281.
DOI: [10.3390/ani10122281](https://doi.org/10.3390/ani10122281)

Conflicto de intereses. Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Declaración de contribución del autor. J Martínez-Durán: Conceptualización, curación de datos, investigación, validación, visualización, escritura y redacción. O. Duverger-Tellez: Metodología, investigación. N. Díaz-Martínez: Metodología, Investigación. L. Interian-Alvarez: Metodología, Investigación. R. Denis-García: Conceptualización, Supervisión. Z. López-Abreu: Metodología, Investigación. MD Quintana-Utra: Metodología, Escritura. A. Palacios-Espinosa: Curación de datos, Análisis formal.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)