






Efecto del estrés anisomótico sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides ovinos

Effect of anisotonic stress on the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of ram sperm

Efeito da tensão anisomótica na integridade estrutural e funcional do plasma e da membrana acrossômica dos espermatozóides de ovinos

Jorge Rubio-Guillén^{1*}, Carla Osorio-Meléndez¹, Decio González-Villalobos¹, Héctor Nava-Trujillo² y Armando Quintero-Moreno¹

¹Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ). Apdo. 15252. 4005-A. Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: (JR) jorgeluis.rubio@gmail.com, ; (CO) carlaosorio85@gmail.com, ; (DG) decio.gonzalez@gmail.com, ; (AQ) armando.quintero@fcv.luz.edu.ve, . ²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. hectornava00@gmail.com, .

Resumen

La integridad de la membrana plasmática (MP) y del acrosoma (MA) han sido dos de los parámetros de valoración seminal más estudiados por su rol preponderante como límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células. Con miras a valorar más objetivamente los efectos del estrés osmótico sobre la integridad de la MP y MA, así como la relación de cambio ocurrido durante la criopreservación seminal, se evaluaron cinco eyaculados recién colectados, refrigerados a 5 °C y descongeladas por morueco/sesión durante 5 semanas consecutivas. Mediante la tinción eosina-nigrosina (EN) se evaluó la vitalidad (VIT), las morfo anomalías y la respuesta celular luego de realizar las pruebas de resistencia osmótica (ORT), y de endósmosis (HOST). El efecto directo de la anisomosis y la criopreservación sobre las variables dependientes fueron analizados mediante el procedimiento GLM (SAS[®]) y cuando se observaron

Recibido: 26-09-2020 • Aceptado: 23-03-2021.

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: jorgeluis.rubio@gmail.com

diferencias, se cuantificaron los efectos mediante el LSMEANS. Todos los valores de calidad espermática estudiados fueron afectados significativamente ($P < 0,001$) por la criopreservación (VIT, ORT, HOST). El ORT demostró como el acrosoma fue una de las estructuras más afectadas por la criopreservación ($P < 0,001$). En conclusión, el presente estudio confirma que el estrés anisotómico afecta la célula espermática de manera importante, comprometiendo los valores referenciales que cuantifican la calidad seminal, sobretodo la MA y MP.

Palabras clave: estrés osmótico, semen, calidad espermática, ovinos.

Abstract

The integrity of the plasma membrane (MP) and the acrosome (MA) have been two of the most studied seminal evaluation parameters due to their role as a cell boundary and because they are responsible for interactions between cells effective. To assessing more objectively the effects of osmotic stress on the integrity of the PM and MA, as well as the rate of change that occurred during seminal cryopreservation, five freshly collected ejaculates were evaluated, refrigerated at 5 °C and thawed per ram/session during 5 consecutive weeks. Using eosin-nigrosin (EN) staining, vitality (VIT), morpho abnormalities and cellular response were evaluated after performing osmotic resistance (ORT) and endosmosis (HOST) tests. The direct effect of anysosmosis and cryopreservation on the dependent variables were analyzed using the GLM procedure (SAS[®]) and when differences were observed, the effects were quantified using the LSMEANS. All the sperm quality values studied were significantly affected ($P < 0.001$) by cryopreservation (VIT, ORT, HOST). The ORT demonstrated how the acrosome was one of the structures most affected by cryopreservation ($P < 0.001$). In conclusion, the present study confirms that anysosmotic stress affects the sperm cell in an important way, compromising the reference values that quantify semen quality, especially MA and MP.

Key words: osmotic stress, semen, sperm quality, ram.

Resumo

A integridade da membrana plasmática (PM) e do acrossoma (AM) foram dois dos parâmetros mais estudados de avaliação seminal devido ao seu papel predominante como limites celulares e porque são responsáveis por interações celulares eficazes. A fim de avaliar mais objetivamente os efeitos do stress osmótico na integridade PM e AM, bem como a taxa de mudança que ocorre durante a criopreservação seminal, foram avaliados cinco ejaculados recentemente recolhidos, refrigerados a 5 °C e descongelados por morueco/sessão durante 5 semanas consecutivas. A coloração Eosin-nigrosina (EN) foi utilizada para avaliar a vitalidade (VIT), morfo-normalidades e resposta celular após teste de resistência osmótica (ORT) e teste de endosmose osmótica (HOST). O

efeito directo da anisomose e criopreservação sobre as variáveis dependentes foi analisado utilizando o procedimento GLM (SAS®) e quando foram observadas diferenças, os efeitos foram quantificados utilizando LSMEANS. Todos os valores de qualidade de esperma estudados foram significativamente ($P < 0,001$) afectados pela criopreservação (VIT, ORT, HOST). O ORT mostrou como o acrossoma era uma das estruturas mais afectadas pela criopreservação ($P < 0,001$). Em conclusão, o presente estudo confirma que o stress anisomótico afecta significativamente a célula espermática, comprometendo os valores de referência que quantificam a qualidade do esperma, especialmente a MA e a MP.

Palavras-chave: stress osmótico, sémén, qualidade do esperma, ovelhas.

Introducción

Los ovinos en Venezuela tienen un gran potencial socioeconómico, ya que se podrían establecer exitosamente en ecosistemas poco útiles para la crianza de bovinos, obteniendo buenos índices en producción de carne (Villasmil *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de las ventajas comparativas y la diversidad de ambientes a los cuales ellos se adaptan, la disponibilidad de información de programas de mejoramiento reproductivo en estas especies es escasa (Yániz *et al.*, 2015). En zonas tropicales su cría se ha destinado a pequeños productores, en condiciones extensivas, en donde el uso de la tecnología actual es casi inexistente, reportándose solamente en el ámbito científico nacional algunos hallazgos sobre calidad seminal de reproductores utilizados para inseminación artificial (IA) (Rubio-Guillén *et al.*, 2012 y 2014a).

En la industria ovina y en especial en Latinoamérica el uso de la IA con semen criopreservado es prácticamente inexistente, motivado al hecho de que la IA con semen descongelado reporta resultados desfavorables debido a la imposibilidad del operador de depositar el semen al final del cervix o de manera

Introduction

Sheep in Venezuela have great socioeconomic potential, since they could be successfully established in ecosystems that are not very useful for raising cattle, obtaining good rates of meat production (Villasmil *et al.*, 2011). However, despite the comparative advantages and the diversity of environments to which they adapt, the availability of information on reproductive improvement programs in these species is scarce (Yániz *et al.*, 2015). In tropical areas, their breeding has been destined to small producers, in extensive conditions, where the use of current technology is almost non-existent, with only some findings on the semen quality of rams used for artificial insemination (AI) being reported in the national scientific field (Rubio-Guillén *et al.*, 2012 and 2014a).

In the sheep industry and especially in Latin America, the use of AI with cryopreserved semen is practically non-existent, due to the fact that AI with thawed semen reports unfavorable results due to the inability of the operator to deposit the semen at the end of the cervix or intrauterine way, a fact that favors suboptimal results.

intrauterina, hecho que propicia resultados sub-óptimo. Otra variante importante corresponde a la viabilidad espermática post descongelado que, en ovinos es inferior a la obtenida en toros (Rubio-Guillén, 2017), probablemente debido a que no se ha establecido una presión de selección genética en base a ejemplares buenos congeladores, no obstante, esta situación conduce a buscar nuevas alternativas que evalúen la calidad seminal de muestras destinadas a IA. Las pruebas que miden el estrés osmótico son una alternativa viable, ya que, podrían ser usadas para predecir la congelabilidad (Quintero-Moreno *et al.*, 2005 y 2011; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) debido a que el proceso de congelación altera de manera sustancial la osmolaridad del semen.

Basado en la tolerancia osmótica, actualmente existen un gran número de pruebas que someten las muestras seminales a condiciones de baja osmolaridad (Nava-Trujillo *et al.*, 2012; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) o alta osmolaridad (Quintero-Moreno *et al.*, 2005) para evaluar la integridad funcional de la MP y/o MA durante todo el proceso y así establecer si hay un alto porcentaje de espermatozoides viables pos descongelación (González-Villalobos, 2017; Peris-Frau *et al.*, 2020). En base a los hechos explicados se pretende analizar si existe una relación estrecha entre la osmo-adaptación de espermatozoides recién colectados, refrigerados, descongelados y la calidad seminal de reproductores ovinos tropicales.

Another important variant corresponds to post-thaw sperm viability, which in sheep is lower than that obtained in bulls (Rubio-Guillén, 2017), probably due to the fact that a genetic selection pressure has not been established based on good freezer specimens, no However, this situation leads to the search for new alternatives that evaluate the seminal quality of samples destined for AI. Tests that measure osmotic stress are a viable alternative, since they could be used to predict freezability (Quintero-Moreno *et al.*, 2005 and 2011; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) because the freezing process substantially alters the osmolarity of the semen.

Based on osmotic tolerance, there are currently a large number of tests that subject seminal samples to low osmolarity conditions (Nava-Trujillo *et al.*, 2012; Rubio-Guillén *et al.*, 2014a; Peris-Frau *et al.*, 2020) or high osmolarity (Quintero-Moreno *et al.*, 2005) to evaluate the functional integrity of PM and/or MA throughout the process and thus establish if there is a high percentage of viable sperm after thawing (González-Villalobos, 2017; Peris-Frau *et al.*, 2020). Based on the facts explained, it is intended to analyze whether there is a close relationship between the osmo-adaptation of recently collected, refrigerated, thawed sperm and the seminal quality of tropical sheep breeders.

Materials and methods

Location and characterization of the experimental area

The study was carried out at the Centro Experimental de Producción

Materiales y métodos

Ubicación y caracterización del área experimental

El estudio fue realizado en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA-LUZ), ubicado en el km 25 a la vía a Perijá, municipio Cañada de Urdaneta, estado Zulia. Zona agroecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, a 80 msnm con temperatura anual entre 29,5 y 34 °C (Ewel *et al.*, 1968).

Unidades experimentales y recolección/procesamiento del semen

Se utilizaron muestras seminales recién colectadas y criopreservadas de cinco ovinos mestizos genéticamente probados y de razas adaptadas a condiciones tropicales (ovejos de pelo con predominio West African, Dorper y Santa Inés). Los eyaculados fueron colectados los días martes y viernes entre las 7:00 y 10:00 de la mañana, mediante vagina artificial temperada a 39 °C, durante cinco semanas consecutivas. Se obtuvieron un total de 25 repeticiones de los cinco ovejoes reproductores adultos (5 x 5). Después de la evaluación seminal de rutina (motilidad, masal e individual y concentración espermática), las muestras clasificadas como idóneas para congelar fueron diluidas con una metodología de un solo paso de criopreservación, mezclando el semen con una solución madre con 20 % de yema de huevo, 60 % de agua estéril bidestilada y 20 % del diluyente comercial Triladyl®.

El primer diluyente crioprotector utilizado contenía yema de huevos frescos de gallinas criollas. El 60 % de

Animal (CEPA-LUZ), located at km 25 road to Perijá, Cañada de Urdaneta municipality, state of Zulia. Agroecologically characterized as a tropical dry forest, at 80 meters above sea level with an annual temperature between 29.5 and 34 °C (Ewel *et al.*, 1968).

Experimental units and semen collection/processing

Freshly collected and cryopreserved seminal samples from five genetically tested crossbred sheep and breeds adapted to tropical conditions (predominantly West African, Dorper and Santa Inés hair sheep) were used. The ejaculates were collected on Tuesdays and Fridays between 7:00 and 10:00 in the morning, using an artificial vagina tempered at 39 °C, for five consecutive weeks. A total of 25 repetitions were obtained from the five adult breeding sheep (5 x 5). After routine seminal evaluation (motility, mass and individual, and sperm concentration), the samples classified as suitable for freezing were diluted with a one-step cryopreservation methodology, mixing the semen with a stock solution containing 20 % yolk. egg, 60 % sterile double distilled water and 20 % commercial diluent Triladyl®.

The first cryoprotective diluent used contained fresh egg yolk from Creole hens. Sixty percent sterile water was taken from double-distilled diluents. The second cryoprotectant used was based on glycerol recommended for freezing semen of smaller ruminants, 20 % Triladyl®. It was homogenized slowly in a thermostet water bath at 38 °C. After mixing the semen with

agua estéril fue tomada de diluentes bidestilados. El segundo crioprotector utilizado fue con base de glicerol recomendado para la congelación de semen de rumiantes menores, Triladyl® al 20 %. Se homogenizó lentamente en baño maría termoestable a 38 °C. Luego de mezclado el semen con esta solución madre se efectuó el llenado de las minipajuelas de 0,25 mL. Posterior a este tiempo, se procedió a estabilizar las muestras seminales envasadas a 5 °C durante un mínimo de dos horas y un máximo de tres, donde se obtuvo una marcada reducción de movimiento y minimización del gasto de energía, tal como lo recomiendan Rodríguez-Martínez (2000) y Vera-Muñoz (2008).

Al culminar esta estabilización seminal, las minipajuelas fueron congeladas por lotes, en cavas de anime que contenían nitrógeno líquido (NL) en un proceso que constaba de dos pasos. Primeramente, se estabilizaron por 10 minutos en vapores de NL a 5 cm por encima de la superficie, posteriormente se sumergieron en el mismo a -196 °C y se almacenaron en un termo-tanque (MVE®, Millenium).

Análisis del semen fresco, refrigerado y congelado

Vitalidad espermática

Esta prueba se realizó colocando una gota de 10 µL de semen fresco diluido (1:400) en un portaobjeto a 38 °C sobre una platina termostable, incluyendo sobre esta gota de semen, 10 µL del colorante supravital EN; al cabo de 30 seg se homogenizó suavemente y se realizó un extendido fino. Los frotis se observaron en un microscopio óptico a 1000X, cuantificando un total de 200 espermatozoides.

this stock solution, the 0.25 mL mini-straws were filled. After this time, the seminal samples packaged at 5 °C were stabilized for a minimum of two hours and a maximum of three, where a marked reduction in movement and minimization of energy expenditure was obtained, as recommended by Rodríguez-Martínez (2000) and Vera-Muñoz (2008).

Upon completion of this seminal stabilization, the mini-straws were batch frozen in styrofoam cellars containing liquid nitrogen (NL) in a two-step process. First, they were stabilized for 10 minutes in NL vapors at 5 cm above the surface, later they were immersed in it at -196 °C and stored in a thermo-tank (MVE®, Millenium).

Analysis of fresh, chilled and frozen semen

Sperm vitality

This test was performed by placing a 10 µL drop of diluted fresh semen (1:400) on a slide at 38 °C on a thermoregulated stage, including on this drop of semen, 10 µL of supravital EN stain; after 30 sec it was gently homogenized and a fine spread was made. The smears were observed in an optical microscope at 1000X, quantifying a total of 200 spermatozoa.

Morphological abnormalities

With the same smear made to assess sperm vitality, the morphological abnormalities of the freshly collected, refrigerated and cryopreserved seminal samples were quantified. For this, the cells were classified according to their appearance into normal and abnormal, and expressed as a percentage (%).

Anormalidades morfológicas

Con el mismo frotis hecho para valorar la vitalidad espermática se cuantificaron las morfoanomalías de las muestras seminales recién recolectadas, refrigeradas y criopreservadas. Para esto, las células fueron clasificadas según su apariencia en normales y anormales, y expresados en porcentaje (%). Estos últimos: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anomalías en el flagelo (número, forma y tamaño), así como signos de inmadurez en forma de presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD).

Evaluación del acrosoma

Para visualizar su apariencia se utilizó una técnica sencilla con EN para valorar la parte apical del acrosoma en espermatozoides, tal como se ha documentado en experiencias previas en espermio de toros (Rubio-Guillén, 2006), cerdos (Quintero-Moreno *et al.*, 2004), ovinos (Rubio-Guillén *et al.*, 2013) y caprinos (Rubio-Guillén *et al.*, 2014a).

Esta prueba fue realizada al semen fresco, refrigerado y descongelado. Se observó presencia del acrosoma intacto (NAR) y cuando el mismo estuvo ausente, o alterado se contabilizó como acrosoma alterado (*Damage Apical Ridge*), y cuando estaba ausente fue cuantificado como MAR (*Missing Apical Ridge*). El resultado final de NAR, DAR y MAR se expresó en porcentaje (%).

The latter: head defects (number, size and appearance), intermediate piece defects (location and appearance), abnormalities in the flagellum (number, shape and size), as well as signs of immaturity in the form of the presence of a proximal cytoplasmic drop (GCP) and distal (GCD).

Acrosome evaluation

To visualize its appearance, a simple technique with EN was used to assess the apical part of the acrosome in sperm, as has been documented in previous experiences with sperm from bulls (Rubio-Guillén, 2006), pigs (Quintero-Moreno *et al.*, 2004), sheep (Rubio-Guillén *et al.*, 2013) and goats (Rubio-Guillén *et al.*, 2014a).

This test was performed on fresh, chilled and thawed semen. Presence of intact acrosome (NAR) was observed and when it was absent or altered it was counted as altered acrosome (Damage Apical Ridge), and when it was absent it was quantified as MAR (Missing Apical Ridge). The final result of NAR, DAR and MAR was expressed as a percentage (%).

Modified Endosmosis Test (HOST-EN)

The HOST-EN test was performed by subjecting a 50 μ L sample of fresh, chilled and thawed semen to two hypotonic media, the first was 154 mOsm.L⁻¹, and the second was 102 mOsm.L⁻¹, for both. In cases, the incubation was for 30 minutes, in 1.5 mL eppendorf tubes where 500 μ L of these hypotonic solutions were added, tempered in a water bath at 38 °C. After this incubation time, the sperm were counted up to a total of

Prueba de Endosmosis modificada (HOST-EN)

La prueba HOST-EN se realizó sometiendo una muestra de 50 μL de semen fresco, refrigerado y descongelado a dos medios hiposmóticos, el primero, fue de 154 mOsm.L^{-1} , y el segundo de 102 mOsm.L^{-1} , para ambos casos la incubación fue durante 30 minutos, en tubos eppendorf de 1,5 mL donde se agregaban 500 μL de estas soluciones hiposmóticas, temperadas en un baño de maría a 38 °C. Transcurrido este tiempo de incubación, se contaron los espermatozoides hasta un total de 100, observando la reacción positiva (figura 1; tomada de Rubio-Guillén *et al.*, 2014a). Se categorizaron las muestras evaluadas en cuatro categorías, expresadas en porcentaje (%), tal como se explica:

Espermatozoides no coloreados con eosina (VIVOS) y flagelos enrollados (+HOST).

Espermatozoides coloreados con eosina (MUERTOS) y flagelos enrollados (+HOST).

Espermatozoides no coloreados con eosina (VIVOS) y flagelos no enrollados (-HOST).

Espermatozoides coloreados con eosina (MUERTOS) y flagelos no enrollados (-HOST).

Osmotic resistance test (ORT)

Prueba de resistencia osmótica (ORT)

En un baño de maría a 38 °C (tubo de 1,5 mL) se incubó una alícuota de 50 μL del semen fresco, refrigerado y descongelado durante 30 minutos en un medio hiposmótico (ORT) de

100, observando la positiva reacción (Figure 1; taken from Rubio-Guillén *et al.*, 2014a). The samples evaluated were categorized into four categories, expressed as a percentage (%), as explained:

Spermatozoa not stained with eosin (LIVE) and coiled flagella (+HOST).

Eosin-stained sperm (DEAD) and coiled flagella (+HOST).

Spermatozoa not stained with eosin (LIVE) and flagella not coiled (-HOST).

Eosin-stained sperm (DEAD) and unrolled flagella (-HOST).

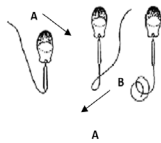
Osmotic resistance test (ORT)

In a 38 °C water bath (1.5 mL tube), a 50 μL aliquot of fresh, refrigerated and thawed semen was incubated for 30 minutes in a hyposmotic medium (ORT) of 154 mOsm.L^{-1} . A small drop was taken and mixed gently with 10 μL of the EN dye. In the light microscope, 100 sperm were counted and the acrosomic reactions already described (DAR and MAR) were observed.

In the present study, a slight modification was made to the initial test described by Schilling and Vengust (1985), obviating the gentle centrifugation step to concentrate sperm. Two aliquots of 50 μL fresh, chilled or thawed semen were taken. One of the samples was placed in 500 μL of the hyposmotic medium (102 or 154 mOsm.L^{-1}) and the other, in a control. After incubating the samples, the stained smears were evaluated in an optical microscope and directly on the slide, the spermatozoa were counted up to a total of 100, observing the number of altered acrosomes (MAR or DAR, figure 2; Rubio-Guillén *et al.*,

154 mOsm.L⁻¹. Una pequeña gota fue tomada y mezclada suavemente con 10 µL del colorante EN. En el microscopio óptico, se contaban 100 espermatozoides y se observaron las reacciones acrosómicas ya descritas (DAR y MAR).

2012). The total DAR or MAR of the hypotonic medium and the isosmotic medium was added, divided by two and the final result was obtained, expressed as a percentage (% ORT = (% DAR/MAR hypotonic medium + % DAR/MAR isosmotic medium)/2).



A



B

Figura 1. A. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente a la prueba. B. Espermatozoides de rumiantes reaccionados a la prueba (Enrollados).

Figure 1. A. Schematic representation of spermatozoa reacted positively to test. B. Sperm from ruminants reacted to test (Coiled).

En el presente estudio, se realizó una modificación leve a la prueba inicial descrita por Schilling y Vengust (1985), obviando el paso de centrifugado suave para concentrar espermatozoides. Se tomaron dos alícuotas de semen fresco, refrigerado o descongelado de 50 µL. Una de las muestras se colocó en 500 µL del medio hiposmótico (de 102 ó 154 mOsm.L⁻¹) y la otra, en un testigo. Luego de incubar las muestras, los frotis teñidos se evaluaron en un microscopio óptico y directamente sobre el portaobjetos

Statistic analysis

The variables (vitality, DAR, ORT, HOST-EN) of the fresh semen samples just collected, refrigerated and thawed from each of the five adult sheep were evaluated using the General Linear Model. When significant effects of the independent variables were found on the dependent variables, the effect was quantified using the LSMEANS procedure. The mathematical model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_{j(i)} + \epsilon_{ijk}$$

Where:

se contaron los espermatozoides hasta un total de 100, observando el número de acrosomas alterados (MAR o DAR, figura 2; Rubio-Guillén *et al.*, 2012). Se sumó el total de DAR o MAR del medio hiposmótico y del medio isosmótico, se dividió entre dos y se obtuvo el resultado final, expresado en porcentaje (%ORT= (%DAR/MAR medio hiposmótico + %DAR/MAR medio isosmótico)/2).

Y_{ijk} = Response translated into semen quality assessment parameters, which included assessment tests of the structural integrity of the PM and MA (vitality and DAR), and assessment tests of the functional integrity of the MP and MA (ORT and HOST-EN).

μ = general mean.

T_i = effect of the i -th treatment (i = fresh/chilled/thawed semen).

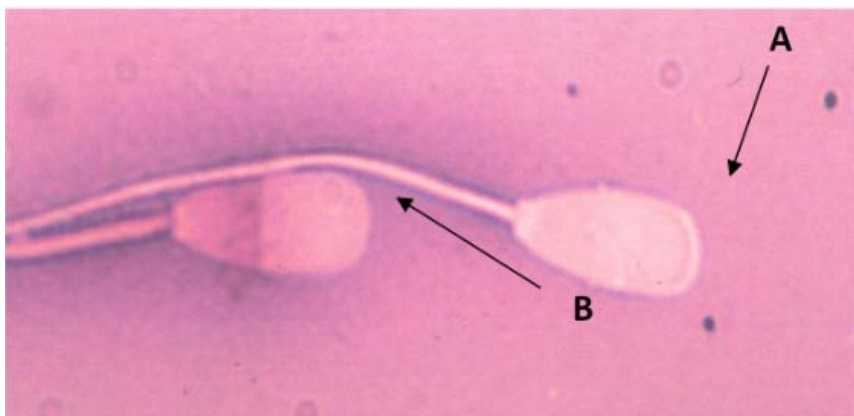


Figura 2. Espermatozoides de rumiante teñidos con eosina-nigrosina (A: espermatozoide con acrosoma intacto, B: espermatozoide con pérdida del acrosoma).

Figure 2. Ruminant sperm stained with eosin-nigrosin (A: sperm with intact acrosome, B: sperm with loss of acrosome).

Análisis estadístico

Las variables (vitalidad, DAR, ORT, HOST-EN) de las muestras de semen fresco recién recolectado, refrigerado y descongelado proveniente de cada uno de los cinco ovinos adultos, fueron evaluadas utilizando el Modelo Lineal General. Cuando se encontraron

$A(T)_j(i)$ = effect of the j -th animal nested within the i -th treatment.

e_{ijk} = experimental error, assumed normal and independently distributed with zero mean and variance σ^2 DNI $\sim (0, \sigma^2$ DNI).

The effect of anisomosis and seminal freezing (nesting the animal

efectos significativos de las variables independientes sobre las dependientes, se cuantificó el efecto mediante el procedimiento LSMEANS. El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A(T)_j(i) + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Respuesta traducida en parámetros de valoración de la calidad seminal, que incluyeron pruebas de valoración de la integridad estructural de la MP y MA (vitalidad y DAR), y pruebas de valoración de la integridad funcional de la MP y MA (ORT y HOST-EN).

μ = media general.

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento (i = semen fresco/refrigerado/descongelado).

$A(T)_{j(i)}$ = efecto del j -ésimo animal anidado dentro del i -ésimo tratamiento.

ε_{ijk} = error experimental, asumido normal e independientemente distribuido con media cero y varianza $\sigma^2 \text{DNI} \sim (0, \sigma^2 \text{DNI})$.

Se evaluó el efecto de la anisomosis y congelación seminal (anidando la variable animal) sobre los parámetros de integridad de la MP y MA. Los datos fueron analizados mediante el SAS (Statistical Analysis System software 8.2), para Windows (SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA).

Resultados y discusión

Valoración de la calidad seminal en las muestras frescas, refrigeradas y descongeladas de ovinos tropicales

Se presentaron un promedio de motilidad individual progresiva,

variable) on the integrity parameters of the MP and MA was evaluated. The data were analyzed using SAS (Statistical Analysis System software 8.2), for Windows (SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA).

Results and discussion

Evaluation of semen quality in fresh, chilled and thawed samples of tropical sheep

There was an average of progressive individual motility, measured subjectively and for fresh semen of 76.02 %. The average volume of the ejaculates was 0.84 mL, the concentration was $2.66 \times 10^9 \text{ spz.mL}^{-1}$ and the percentage of mass motility (1-5) was 4.05. The general means (μ) and the standard error (EE) of characteristics evaluated in fresh, chilled and thawed semen of sheep are shown in Table 1.

All the fresh seminal samples had a pH close to neutrality with an average of 7.61. These five basic parameters coincide in rank similarity with those reported by other authors in different latitudes (Anel *et al.*, 2003; García, 2014; Yániz *et al.*, 2015), even with authors working in tropical areas (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Sheep have a low-volume ejaculate with a high sperm concentration that allows AI to work with mini-straws with doses ranging between 20 and 200 million per dose (Valdez, 2013). In this case, the dilution was made based on $50 \times 10^6 \text{ dose}^{-1}$, similar to that reported in other trials (Valdez, 2013).

DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. MAR (%):

medida subjetivamente y para el semen fresco de 76,02 %. El volumen promedio de los eyaculados fue de 0,84 mL, la concentración de $2,66 \times 10^9$ spz. mL^{-1} y el porcentaje de motilidad masal (1-5) de 4,05. Las medias generales (μ) y el error estándar (EE) de las características evaluadas en semen fresco, refrigerado y descongelado de los ovinos se muestran en el cuadro 1.

Todas las muestras seminales en fresco tuvieron un pH cercano a la neutralidad con 7,61 de promedio. Estos cinco parámetros básicos coinciden en similitud de rango, con los reportados por otros autores en distintas latitudes (Anel *et al.*, 2003; García, 2014; Yániz *et al.*, 2015), inclusive con autores trabajando en zonas tropicales (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Los ovinos cuentan con un eyaculado bajo en volumen y de alta concentración espermática que permite trabajar la IA con minipajuelas con dosis que oscilan entre 20 y 200 millones por dosis (Valdez, 2013). En este caso, la dilución fue hecha en base a 50×10^6 dosis⁻¹, similar a lo reportado en otros ensayos (Valdez, 2013).

Se observó el efecto detrimental del proceso de criopreservación seminal sobre los parámetros de evaluación de la calidad espermática ($P < 0,01$), encontrándose disminución progresiva del porcentaje de vitalidad durante el enfriamiento de 73,02 a 50,25 % y luego por la criopreservación propiamente dicha 24,59%, presentándose diferencias ($P < 0,001$) cuantificables entre los tres tratamientos; mientras que el porcentaje de acrosomas dañados fue de 18,60 % (reflejados en

porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. NAR (%): porcentaje de acrosomas no reaccionados o alterados. Total anomalías (%): incluye las morfoanomalías de la cabeza y flagelo espermático. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endósmosis.

The detrimental effect of the seminal cryopreservation process on the sperm quality evaluation parameters ($P < 0.01$) was observed, finding a progressive decrease in the percentage of vitality during cooling from 73.02 to 50.25 % and then by the cryopreservation itself 24.59 %, with quantifiable differences ($P < 0.001$) between the three treatments; while the percentage of damaged acrosomes was 18.60 % (reflected in DAR (3.94 %) and MAR (14.72 %) for the newly collected ejaculates and DAR of 14.36 % and 16.44 % for the refrigerated and cryopreserved semen, respectively.

When describing the treatments carried out in this trial (freshly collected, refrigerated, thawed) it is important to note that ruminant sperm are especially sensitive to cold damage (Hammerstedt *et al.*, 1990), and in the case of bulls and rams, is probably due to an unsuitable relationship between cholesterol and phospholipids (Vera-Muñoz, 2008), as well as a lower ratio of polyunsaturated/saturated fatty acids in their PM, when compared to species such as rabbit, man or dog (Giraud *et al.*, 2000). For this reason, steps such as the addition of the cryoprotectant, cooling, freezing, storage in liquid nitrogen and thawing

DAR (3,94 %) y MAR (14,72 %) para los eyaculados recién recolectados y DAR de 14,36 % y 16,44 % para el semen refrigerado y criopreservado, respectivamente.

cause a greater deterioration in PM and MA (Zhu and Liu, 2000; Utt, 2015), which is observed reflected in this trial by reporting a decrease in individual motility and vitality upon

Cuadro 1. Características generales (μEE) en el semen fresco, refrigerado y descongelado de ovinos tropicales.

Table 1. General characteristics (μEE) in fresh, chilled and thawed semen of tropical sheep.

Características	FYW/fb FYW ^a WUX ^c	Refrigerado	Descongelado
Vitalidad (%)	73,02 ± 1,79 ^a	50,25 ± 2,78 ^b	24,59 ± 1,39 ^c
DAR (%)	3,94 ± 1,02 ^b	14,36 ± 2,25 ^a	16,44 ± 1,11 ^a
MAR (%)	14,72 ± 1,83 ^c	32,37 ± 4,03 ^b	59,72 ± 1,99 ^a
NAR (%)	81,68 ± 1,54 ^a	53,28 ± 3,38 ^b	23,80 ± 1,67 ^c
Total gotas (%)	0,10 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,07 ^a	0,03 ± 0,03 ^a
Cabeza Anormal (%)	5,60 ± 1,17 ^b	10,95 ± 2,59 ^a	10,92 ± 1,27 ^a
ORT (%)	80,91 ± 0,09 ^a	74,55 ± 1,90 ^b	68,88 ± 1,07 ^b
HOST+EN- (%)	75,27 ± 1,42 ^a	48,52 ± 3,13 ^b	26,78 ± 1,55 ^c

Valores entre paréntesis denotan intervalos de confianza de la variable estudiada DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. MAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. NAR (%): porcentaje de acrosomas no reaccionados o alterados. Total anomalías (%): incluye las morfoanomalías de la cabeza y flagelo espermático. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endósmosis. ^{a,b,c}Letras diferentes denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,001).

Values in parentheses denote confidence intervals of the variable studied DAR (%): percentage of reacted or altered acrosomes. MAR (%): percentage of reacted or altered acrosomes. NAR (%): percentage of unreacted or altered acrosomes. Total abnormalities (%): includes head morfoanomalies and spermatic flagellum. ORT (%): sperm reacted to the osmotic resistance test. HOST+EN- (%): positive sperm to endosmosis test. ^{a, b, c}Different letters denote statistically significant differences (P <0.001).

Al describir los tratamientos realizados en este ensayo (recién recolectado, refrigerado, descongelado) es importante destacar que, los espermatozoides de rumiantes son especialmente sensibles al daño por frío (Hammerstedt *et al.*, 1990), y para el caso del toro y el morueco, probablemente se deba a una relación no idónea entre colesterol y fosfolípidos (Vera-Muñoz, 2008), así como, una menor relación ácidos

thawing (Foote and Parks, 1993; Guillaume *et al.*, 2004).

Parameters as important as VIT (73.02 % vs. 50.25 % vs. 24.59 %) and NAR (81.68 % vs. 53.28 % vs. 23.80 %) substantially worsened when increasing the cold level (fresh vs chilled vs defrosted), respectively. Some authors comment that just by diluting the samples to start cryoprocessing, the percentage of live spermatozoa can be affected

grasos polinsaturados/saturados en su MP, si se comparan con especies como el conejo, hombre o perro (Giraud *et al.*, 2000). Por esta razón, pasos como la adición del crioprotector, el enfriamiento, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causan un deterioro mayor en la MP y MA (Zhu y Liu, 2000; Utt, 2015), lo cual se observa reflejado en este ensayo al reportarse una disminución de la motilidad individual y vitalidad al descongelado (Foote y Parks, 1993; Guillaume *et al.*, 2004).

Parámetros tan importantes como la VIT (73,02 % *vs.* 50,25 % *vs.* 24,59 %) y el NAR (81,68 % *vs.* 53,28 % *vs.* 23,80 %) empeoraron sustancialmente al incrementar el nivel de frío (fresco, *vs.* refrigerado *vs.* descongelado), respectivamente. Algunos autores comentan que con solo diluir las muestras para comenzar el crioprocesado, se puede afectar hasta un 30% el porcentaje de espermatozoides vivos, en lo que se llama “efecto dilutor” (Leahy *et al.*, 2010), sin contar el bien conocido “estrés por frío” que puede ocurrir cuando las muestras son llevadas de 38 a 5°C para su estabilización (Vera-Muñoz, 2001; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008) o el paso por el punto de congelación en el descenso térmico desde 5 hasta el -196 °C de la temperatura de permanencia en NL “fase de transición termotrópica”, donde puede ocurrir un daño subletal sobre todo en la MA, producto de la crioinjuria (Varisli *et al.*, 2009; Valdez, 2013).

by up to 30 %, in what is called the “dilutor effect” (Leahy *et al.*, 2010), not counting the well-known “Cold stress” that can occur when the samples are brought from 38 to 5 °C for their stabilization (Vera-Muñoz, 2001; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008) or the passage through the freezing point in the thermal decrease from 5 up to -196 °C of the temperature of permanence in NL “thermotropic transition phase”, where a sublethal damage can occur especially in the MA, product of cryoinjuria (Varisli *et al.*, 2009; Valdez, 2013).

The seminal freezing protocol was done in a single step, unlike many authors who work with the two-step technique (Anel *et al.*, 2003; Yániz *et al.*, 2015). The problem of glycerization at laboratory temperature (25 °C) is the effect on post-thaw sperm viability, due to the toxic effects that have been reported for a long time (Rodríguez-Martínez, 2000). However, working in this way and quickly allows greater stabilization in the final freezing container in NL, which avoids changes in temperatures in the artisanal filling and stamping, after the seminal samples have already been cooled. In cold stress (5 °C), the main changes include reduced motility and morphological integrity of the sperm (García, 2014). These changes contribute to the accumulation of toxic metabolic products, mainly reactive oxygen species formed by the peroxidation of the membranes (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

In the case of MAR in the 32.37 % chilled and thawed semen (MAR: 59.72 %), this variable is affected by

El protocolo de congelación seminal se hizo a un solo paso a diferencia de muchos autores que trabajan con la técnica de dos pasos (Anel *et al.*, 2003; Yániz *et al.*, 2015). El problema de la glicerización a temperatura de laboratorio (25°C) es la afectación de la viabilidad espermática post-descongelación, debido a los efectos tóxicos que han sido reportados desde hace mucho tiempo atrás (Rodríguez-Martínez, 2000). Sin embargo, trabajar así y de manera rápida permite mayor estabilización en el recipiente final de congelación en NL, lo que evita los cambios de temperaturas en el llenado y timbrado artesanal, luego que ya han sido enfriadas las muestras seminales. En el estrés por frío (5 °C), los principales cambios incluyen reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide (García, 2014). Estos cambios contribuyen a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, principalmente especies reactivas de Oxígeno formados por la peroxidación de las membranas (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2008).

Para el caso de los MAR en el semen refrigerado de 32,37 % y descongelado (MAR: 59,72 %), se ve afectada esta variable por el daño criogénico producido a las muestras procesadas. Lo anterior indica, que el porcentaje de NAR disminuyó abruptamente de 81,68 % a 32,37 % con el daño por frío, y posteriormente desciende a 23,80 % al ser congelado en NL; estos valores son similar a lo reportado para ovinos de pelo en condiciones tropicales (Vargas, 2015). Pursel y Johnson (1974) plantearon por primera vez

the cryogenic damage produced to the processed samples. The foregoing indicates that the percentage of NAR decreased abruptly from 81.68 % to 32.37 % with the cold damage, and later it drops to 23.80 % when frozen in NL; These values are similar to those reported for hair sheep in tropical conditions (Vargas, 2015). Pursel and Johnson (1974) proposed for the first time that AM could be affected by cryopreservation action, however, the structural integrity of PM could not be damaged (Zhu and Liu, 2000), suggesting that the damage of each domain of PM can occur independently (Chan *et al.*, 1991; Peris-Frau *et al.*, 2020).

During the cryo-capacitation that can occur in the cryogenic processing of the samples, the proteins within the PM of the sperm migrate thanks to the loss of intramembrane cholesterol, thus forming domains with or without the latter (Vera-Muñoz, 2001). In areas where there are no proteins, the MP and MA will fuse. This fusion begins the exocytosis process of AM (Dacheux and Dacheux, 2001).

The ability of the sperm to perform this acrosome reaction, in response to contact with the zona pellucida, can be used as an indication of sperm fertility (Dzuik, 1996; Utt, 2015). In eutherian mammalian sperm, it has been postulated that premature acrosome loss prevents sperm-oocyte fusion (Yanagimachi, 1994; Peris-Frau *et al.*, 2020). Only spermatozoa that can perform the acrosomal reaction in synchronization with the penetration phase of the oocyte, have the ability to pass through the zona

que la MA podría afectarse por acción de la criopreservación, no obstante, la integridad estructural de la MP podría no sufrir daño (Zhu y Liu, 2000), sugiriendo que el daño de cada dominio de la MP puede producirse de manera independiente (Chan *et al.*, 1991; Peris-Frau *et al.*, 2020).

Durante la criocapacitación que puede ocurrir en el procesado criogénico de las muestras, las proteínas dentro de la MP del espermatozoide migran gracias a la pérdida de colesterol intramembrana, formando así dominios con o sin estas últimas (Vera-Muñoz, 2001). En las zonas donde no hay proteínas se fusionará la MP y la MA. Esa fusión comienza el proceso de exocitosis de la MA (Dacheux y Dacheux, 2001).

La habilidad del espermatozoide para realizar esta reacción del acrosoma, en respuesta al contacto con la zona pelúcida, puede ser utilizada como un indicativo de fertilidad del espermatozoide (Dzuik, 1996; Utt, 2015). En espermatozoides de mamíferos euterianos se ha postulado que, la pérdida prematura del acrosoma, previene la fusión del espermatozoide con el ovocito (Yanagimachi, 1994; Peris-Frau *et al.*, 2020). Sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este, para formar un embrión (Tesarik *et al.*, 1993; Januskauskas y Rodríguez-Martínez., 2000). Aunque en ratones, se ha demostrado, como espermatozoides

pellúcida and, as a consequence, fuse with it, to form an embryo (Tesarik *et al.*, 1993; Januskauskas and Rodríguez-Martínez., 2000). Although in mice, it has been shown that sperm with acrosomal reaction prior to contact with ZP3 have an affinity for penetration to this glycoprotein membrane (Jin *et al.*, 2011).

In light of the findings made in sheep, the idea is still maintained that any damage to the MA would cause its contentive enzymes to be released, preventing fertilization, so that, as mentioned above, if the percentage of these alterations is high, it can cause a decrease in fertility (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019). Furthermore, if it is known that this structure is one of the most affected after cryopreservation (Hammersedt *et al.*, 1990; Rubio-Guillén *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012).

Ejaculates in which a large part of the sperm have lost their acrosomes will show lower fertility (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Utt, 2015). In cattle experiments, the induction of the acrosome reaction with the ionophore A23187 was marginally correlated with *in vivo* fertility (Januskauskas *et al.*, 2000). It can be hypothesized that the length of the sperm head may be related to the presence of an intact acrosome (Chen *et al.*, 2019). In contrast, it has been correlated with the sperm morphometry of subpopulations that showed high fertility, when compared with their contemporaries who presented

con reacción acrosomal previa al contacto con la ZP₃ presentan afinidad por penetración a esta membrana glicoprotéica (Jin *et al.*, 2011).

A la luz de los hallazgos hechos en ovinos, se sigue manteniendo la idea que, cualquier daño en la MA provocaría que se liberen sus enzimas contentivas, impidiendo la fecundación, de forma que, como se mencionó anteriormente, si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2019). Más aún, si se sabe que esta estructura es una de las mayormente afectadas luego de la criopreservación (Hammersedt *et al.*, 1990; Rubio-Guillén *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2012).

Los eyaculados en los que gran parte de los espermatozoides han perdido sus acrosomas mostraron menor fertilidad (Rubio-Guillén, 2006; Díaz *et al.*, 2012; Utt, 2015). En experiencias con vacunos, la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo A23187 fue correlacionada marginalmente con la fertilidad *in vivo* (Januskauskas *et al.*, 2000). Se puede hipotetizar que el largo de la cabeza espermática puede ser relacionado con la presencia de un acrosoma intacto (Chen *et al.*, 2019). En contraparte, se ha correlacionado con la morfometría espermática de subpoblaciones que mostraron una fertilidad alta, al compararlo con sus coetáneos que presentaban fertilidades medias y bajas (Rubio-Guillén, 2006).

Efecto del cambio de osmolaridad sobre la MA y MP

En el cuadro 2, se pudo evaluar el resultado de las pruebas de resistencia

medium and low fertility (Rubio-Guillén, 2006).

Effect of the change in osmolarity on MA and MP

In Table 2, it was possible to evaluate the result of the osmotic resistance tests on the structural and functional integrity of MP and MA in various anisotonic conditions (with emphasis on 154 and 102 mOsm.L⁻¹). In the case of structural integrity, a marked effect of cryoprocessing was seen between fresh and thawed samples of all osmolar categories (VIT and DAR; P < 0.001). Also finding significant statistical differences (P < 0.001) between isosmolar vs. hyposmotic. From 79 % VIT for fresh semen, a detriment of 9% was evidenced in the 154 mOsm.L⁻¹ anisotonic condition and up to 16 % for the 102 mOsm.L⁻¹ osmolar condition. In contrast, cryopreserved semen did not show an apparent decrease between hyposmolar treatments (P > 0.01). For all test results, no differences (P > 0.01) were found between the control samples (undiluted) and those diluted in an isosmolar incubation medium of 308 mOsm.L⁻¹; same evidence, when comparing fresh and cryopreserved samples incubated in hyposmotic conditions of 102 mOsm.L⁻¹ vs. 154 mOsm.L⁻¹.

Regarding the evaluation of the functionality of the MP and MA, of the two tests carried out in this experiment HOST-EN and ORT, only the ORT did not present highly significant differences (P > 0.01), although its numerical differences were notable; between refrigerated and thawed semen (74.55 % vs. 68.88 %; P > 0.05).

osmótica sobre la integridad estructural y funcional de MP y MA en varias condiciones de anisomosis (con énfasis en 154 y 102 mOsm.L⁻¹). Para el caso de la integridad estructural se vio un efecto marcado del crioprosesado entre las muestras frescas y descongeladas de todas las categorías osmolares (VIT y DAR; P<0,001). Encontrándose así mismo, diferencias estadísticas significativas (P<0,001) entre los tratamientos isosmolares *vs.* hiposmóticos. Desde un 79 % de VIT para el semen fresco se evidenció un detrimento de 9 % en la condición anisomótica de 154 mOsm.L⁻¹ y de hasta 16 % para la condición osmolar de 102 mOsm.L⁻¹. En contraparte, el semen criopreservado no evidenció disminución aparente entre los tratamientos hiposmolares (P>0,01). Para todos los resultados de las pruebas no se encontraron diferencias (P>0,01) entre las muestras control (sin diluir) y las diluidas en un medio de incubación isosmolar de 308 mOsm.L⁻¹; misma evidencia, al comparar las muestras frescas y criopreservadas incubadas en condiciones hiposmóticas de 102 mOsm.L⁻¹ *vs.* 154 mOsm.L⁻¹.

En cuanto a la evaluación de la funcionalidad de la MP y MA, de las dos pruebas realizadas en este experimento HOST-EN y ORT, solo el ORT no presentó diferencias altamente significativas (P>0,01), aunque sus diferencias numéricas fueron notables; entre el semen refrigerado y descongelado (74,55 % *vs.* 68,88 %; P>0,05). En oposición, el HOST presentó una disminución detectable estadísticamente (P<0,001) entre los tres tratamientos realizados, quedando como sigue: HOST (75,27

In contrast, the HOST presented a statistically detectable decrease (P <0.001) among the three treatments performed, being as follows: HOST (75.27 % *vs.* 48.52 *vs.* 26.78 %) for the freshly collected, refrigerated semen and thawed, respectively. Sperm functionality in terms of resistance to anisomotic incubation has been shown to correlate with *in vitro* fertility (Jeyendran *et al.*, 1984), as well as with the fertility of ruminant females (Rubio-Guillén, 2006).

As some authors (Zhu and Liu, 2000; Peris-Frau *et al.*, 2020) have postulated that the structural and functional damage of the sperm membrane domains can occur individually and not dependently, in this trial, tests were performed structural (NAR) and functional (ORT) assessment of MA and MP (VIT and HOST-EN). All this, looking for a unique test that could evaluate various aspects related to semen quality and correlate them with *in vivo* fertility (Rubio-Guillén *et al.*, 2014b).

Two hypotonic conditions were used in this study (102 and 154 mOsm.L⁻¹) in search of differences in resistance to anisomosis and for the detection of false negatives, since it has been published that hypotonic conditions are recommended for sheep. lower than in large ruminants (Anel *et al.*, 2003). However, under the conditions in which this test was carried out, no statistically significant differences (P> 0.001) were observed between both conditions for any of the three treatments. Reliable conclusion that allows the use of both osmolarities to observe the response to hypotonic

% vs. 48,52 vs. 26,78 %) para el semen recién recolectado, refrigerado y descongelado, respectivamente. La funcionalidad espermática en términos de resistencia a incubación anisotérmica ha sido demostrada que presenta una correlación con la fertilidad *in vitro* (Jeyendran *et al.*, 1984), así como también con la fertilidad de hembras rumiantes (Rubio-Guillén, 2006).

incubation, without detriment to the response due to the appearance of false negatives. For this reason, in sheep this test is still used today, as a faithful estimator of the functional integrity of the PM, as shown by some studies (Valdez, 2013; García, 2014). In ruminants, high and positive correlations have been reported between HOST and the percentage

Cuadro 2. Efecto del estrés anisotérmico sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides ovinos.

Table 2. Effect of anisotermic stress on the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of sheep spermatozoa.

Parámetro		Osmolaridad (mOsm.L ⁻¹)			
		Fresco	Descongelado	Crioinjuria	Descongelado
Vitalidad (%)	Fresco	79,42 ^a ± 2,56	79,31 ^a ± 2,56	70,38 ^{ab} ± 2,60	62,97 ^b ± 2,56
	Descongelado	31,81 ^a ± 2,74	23,31 ^a ± 2,79	22,60 ^a ± 2,69	20,66 ^a ± 2,90
	Crioinjuria	-47,61*	-56*	-47,78*	-42,31*
NAR (%)	Fresco	86,31 ^a ± 3,06	85,29 ^a ± 3,05	80,39 ^a ± 3,10	74,73 ^a ± 3,05
	Descongelado	32,98 ^a ± 3,27	33,05 ^a ± 3,39	19,91 ^{ab} ± 3,26	9,25 ^b ± 3,46
	Crioinjuria	-53,33*	-52,24*	-60,48*	-65,40*
HOST+EN- (%)	Fresco	76,44 ^a ± 2,83	74,61 ^a ± 2,83	77,19 ^a ± 2,82	72,86 ^a ± 2,82
	Descongelado	29,13 ^a ± 3,02	28,32 ^a ± 3,13	24,76 ^a ± 3,02	24,92 ^a ± 3,20
	Crioinjuria	-47,31*	-46,29*	-52,43*	-47,94*
ORT (%)	Fresco	86,38 ^a ± 1,97	86,30 ^a ± 1,96	70,00 ^b ± 2,00	63,55 ^b ± 1,96
	Descongelado	53,22 ^a ± 2,11	43,74 ^a ± 2,14	25,10 ^{ab} ± 2,06	29,47 ^b ± 2,22
	Crioinjuria	-43,16*	-42,56*	-44,90*	-34,08*

Los resultados son expresados en media aritmética ± desviación estándar para las muestras de semen analizadas de los 5 ovinos. ORT (%): espermatozoides reaccionados a la prueba de resistencia osmótica. NAR (%): Porcentaje de acrosomas normales en los espermatozoides evaluados. HOST+EN- (%): espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis y no teñidos con Eosina.

^{a,b,c}Letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas (P<0,01).

*Diferencias estadísticas significativas (P<0,01) entre columnas denotando daño por congelación.

The results are expressed as arithmetic mean ± standard deviation for the analyzed semen samples from the 5 sheep. ORT (%): sperm reacted to the osmotic resistance test. NAR (%): Percentage of normal acrosomes in the sperm evaluated. HOST+EN- (%): sperm positive to endosmosis test and not stained with Eosin.

^{a, b, c}Different letters in the rows denote statistically significant differences (P <0.01).

* Significant statistical differences (P <0.01) between columns denoting damage by freezing.

Como algunos autores (Zhu y Liu, 2000; Peris-Frau *et al.*, 2020) han postulado que el daño estructural y funcional de los dominios de membrana del espermatozoide pueden ocurrir de manera individual y no dependiente, en este ensayo, se realizaron pruebas de valoración estructural (NAR) y funcional (ORT) de la MA y de la MP (VIT y HOST-EN). Todo esto, buscando una prueba única que pudiese evaluar varios aspectos relacionados con calidad seminal y correlacionarlos con la fertilidad *in vivo* (Rubio-Guillén *et al.*, 2014b).

Dos condiciones hiposmóticas fueron utilizadas en este estudio (102 y 154 mOsm.L⁻¹) en busca de diferencias en la resistencia a la anisomosis y con fines de detección de falsos negativos, ya que ha sido publicado que para ovinos son recomendables condiciones de hiposmolaridad más bajas que en los grandes rumiantes (Anel *et al.*, 2003). Sin embargo, en las condiciones en que se realizó este ensayo no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,001$) entre ambas condiciones para ninguno de los tres tratamientos. Conclusión fehaciente que permite el uso de ambas osmolaridades para observar la respuesta a la incubación hiposmótica, sin detrimento de la respuesta por aparición de falsos negativos. Por esta razón, en ovinos se sigue usando esta prueba hoy por hoy, como un fiel estimador de la integridad funcional de la MP, como lo demuestran algunos estudios (Valdez, 2013; García, 2014). En rumiantes, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides

of live sperm, sperm motility, the percentage of normal sperm, and *in vivo* and *in vitro* fertility, both for fresh semen and for thawed semen (Anel *et al.*, 2003; Rubio-Guillén, 2006).

Conclusions

The seminal cryopreservation process alters the functionality of a large proportion of spermatozoa, the acrosome being the structural unit, which is mainly affected. The anysosmotic incubation demonstrated how the acrosome suffers considerably in structural and functional integrity (DAR and ORT), more than MP.

Recommendations

Considering the biological and economic importance of knowing accurately the potential fertility of the ovine semen used in AI, it is recommended to evaluate the seminal samples obtained in this study, in field fertility (nulliparous females) or IVF to better assess sperm quality.

End of English Version

vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco, como para el descongelado (Anel *et al.*, 2003; Rubio-Guillén, 2006).

Conclusiones

El proceso de criopreservación seminal altera la funcionalidad de una

gran proporción de espermatozoides, siendo el acrosoma la unidad estructural, que principalmente es afectada. La incubación anisomótica demostró como el acrosoma sufre considerablemente en integridad estructural y funcional (DAR y ORT), más que la MP.

Ellipses Édition Marketing, S.A. INRA. Paris, France. Chapitre 14: 455-468.

Recomendaciones

Considerando la importancia biológica y económica que implica conocer en forma certera la fertilidad potencial del semen ovino utilizado en la IA, se recomienda evaluar las muestras seminales obtenidas en este estudio, en fertilidad de campo (hembras nulíparas) o FIV para valorar mejor la calidad espermática.

Literatura citada

Anel, L., P. D. Paz, M. Álvarez, C. A. Chamorro, J. C. Boixo, A. Manso, M. González, M. Kaabi, M. and E. Anel. 2003. Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 60: 1293-1308.

Chan, P., D. R. Tredway, B. C. Su, J. Corselle and S. Ren. 1991. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. *Human Reprod.* 6(8): 1115-1118.

Chen, F., L., Gao, H., Zhou, L., Gou, Q., Chen, Y., Gan, X., Sun, Q., Li, and K., Wrang. 2019. The association between sperm head elongation and semen quality. *Andrology* 1-6.

Córdova-Izquierdo, A., M. Córdova-Jiménez, C. Córdova-Jiménez y J. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras *Rev. Vet.* 19(1): 67-79.

Dacheux, F., and J. Dacheux. 2001. L'épididyme et les glandes annexes. *In: La reproduction chez les mammifères et l'Homme.* Coordonateurs: Charles Thibault et Marieclaire Levasseur.

Díaz, A. R., F. Martínez-Pastor, E. Anel, M. Álvarez, L. Anel, J. C. Boixo, J. D. Muro y P. de Paz. 2012. Variación de las técnicas de valoración acrosomal en distintas fases de la conservación de semen ovino. *Producción ovina y caprina N° XXVII SEOC:* 1012-1015.

Dzuik, J. 1996. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 43: 277-282.

Ewel, J., A. Madriz y A. Tosi. 1968. Zonas de vida de Venezuela. 2da. Edición. Editorial Sucre, Caracas. 65 p.

Foote, R. H. and J. E. Parks. 1993. Factors affecting preservation and fertility of bull semen: A brief review. *Reprod. Fert. Dev.* 5: 665-673.

García, W. 2014. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 315 p. <https://ddd.uab.cat/record/127501>

Giraud, M., C. Motta, D. Boucher and G. Grizard. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 15(10): 2160-2164.

Guillaume, M., O. Sabido, P. Durand and R. Levy. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.* 71: 28-37.

González-Villalobos, D. 2017. Cinética del espermatozoide de cerdo y su utilidad como método de evaluación de la calidad seminal. Trabajo de Ascenso categoría de Profesor Titular. Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela. 63 pp.

Hammerstedt, R. H., J. K. Graham and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.

Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, S. J. L. Rodríguez, R. E. Juárez, M. Y. G. Soto and R. A. D. García. 2012. Effect

- of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Rev. Salud Anim.* 34(2): 78-83.
- Januskauskas, A. and H. Rodríguez-Martínez. 2000. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.* 36: 571-574.
- Jeyendran, R. S., H. H. Van der Ven, M. Pérez-Peláez, B. J. Crabo and L. J. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabed, Y. Satouh, S. Baba, K. Chiba and N. Hirohashia. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *PNAS* 108(12): 4892-4896.
- Leahy T., J. I. Marti, N. Mendoza, R. Pérez-Pérez, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrían-Pérez, G. Evans and W. M. C. Maxwell. 2010. High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 137-146.
- Nava-Trujillo, H., A. Quintero-Moreno, C. Osorio, J. Rubio-Guillén, F. Carrillo and G. Finol-Parra. 2012. Use of water test to assess the sperm membrane functional integrity in cryopreserved bull semen. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* Vol. XXI (3): 211-214.
- Peris-Frau, P., A., Soler, M., Iniesta, A., Martín, I., Sánchez, D. Medina, M., Fernández and O., García. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.*: 21: 2781-2008.
- Pursel, V. G., L. A. Johnson. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology.* 1(2):63-68.
- Quintero-Moreno, A., T. Rigau, J. E. Rodríguez-Gil. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. *Theriogenology.* 61:673-690.
- Quintero, A., J. Rubio, T. Rigau y J. E. Rodríguez-Gil. 2005. El test de resistencia hiposmótica: un test promisorio para medir la integridad de la membrana espermática del cerdo. Maracaibo, Venezuela. *Arch. Lat. Prod. Anim.* 4 p.
- Quintero-Moreno A., J. Rubio-Guillén, D. González-Villalobos, J. C. Gutiérrez, N. Madrid-Bury, J. J. Garde. 2011. Identificación de cryodamage on plasma membrane Integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ XXI.* (5): 403-407.
- Rodríguez-Martínez, H. 2000. Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de actualidad. *Internacional Veterinary Information Service (www. ivis.org)*, Ithaca, New Cork, USA.
- Rubio-Guillén, J. 2006. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. 103 p.
- Rubio-Guillén, J., D. González y A. Quintero-Moreno. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cient. FCV-LUZ.* XIX (4): 382-389.
- Rubio-Guillén, J., O. Portillo-Guevara, M. Montero, A. Velásquez, W. Zalahne, D. González-Villalobos, P. Torres-Rodríguez, A. Quintero-Moreno. 2013. Integridad de la membrana plasmática de espermatozoides recién colectados de ovinos en condiciones de trópico seco. *XV Jornadas sobre Producción Animal. AIDA.* Tomo I: 407-409.
- Rubio-Guillén, J., C. Osorio y L. Yamarte. 2014a. Innovadora prueba de valoración seminal ovina utilizando tres (3) test de fácil aplicación en campo. 3er Congreso Venezolano de Ciencia, tecnología e innovación. Del 27-29/11/14. Caracas, Venezuela.
- Rubio-Guillén, J., A. Quintero-Moreno, D. González y C. Osorio. 2014b. Integridad estructural y funcional de la membrana plasmática de

- espermatozoides recién colectados de ovinos tropicales. II Encuentro Andino de Ciencia, Tecnología e innovación. Del 22-24/10/14. Mérida, Venezuela.
- Rubio-Guillén, J., M. Montero, O. Portillo, D. González, J. Aranguren-Méndez, N. Madrid-Bury, Y. Villasmil y A. Quintero-Moreno. 2012. Comparación entre dos grupos raciales de ovinos tropicales mediante pruebas de viabilidad espermática. XIII Jornadas Científico Técnicas de la Facultad de Agronomía LUZ. 21-23/11/12. Maracaibo, Venezuela. 55 p.
- Rubio-Guillén, 2017. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de espermatozoides ovinos tropicales. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 137 p.
- SAS Institute. 2000. SAS user guide: statics. Versión 8.0 Edition SAS institute Inc. Cary, NY. 530 p.
- Schilling, E. and M. Vengust. 1985. Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene* 20: 61-78.
- Tesarik, J., C. Mendoza, J. P. Ramirez, J. Moos. 1993. Solubilized human zona pellucida competes with a fucosylated neoglycoprotein for binding sites on the human sperm surface. *Fertility & Sterility*. 60(2): 344-350.
- Utt, M. 2015 Prediction of bull fertility. *Anim. Reprod. Sci.* Available in: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.011>
- Valdez, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen congelado ovino. Tesis de Maestría. Universidad de Cuenca. Ecuador. 74 p. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>.
- Vargas, P. 2015. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis de Grado a Médico Veterinario. Universidad Nacional del Altiplano. 81 p. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2236>.
- Varisli O., C. Uguz, C. Agca and Y. Agca. 2009. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisomotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 256-268.
- Vera-Muñoz, O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción bovina*. González-Stagnaro C. (Ed.). Edics. Astro Data S.A. Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1-11.
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: *Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito*. Gonzalez-Stagnaro C., E. Soto-Belloso (Eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones ASTRODA S.A. Sección 5(40): 495-504.
- Villasmil, Y., J. Aranguren, N. Madrid-Bury, D. González, J. Rubio-Guillén, C. González-Stagnaro, M. Portillo y F. Yañez. 2011. Edad y peso a la pubertad de ovinos cruzados en el Estado Zulia, Venezuela. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*. 419-422.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. *In: Physiology of reproduction*. Knobil, E. and J.D. Neill (Eds.). 2nd edition. Raven Press, New York. p. 189-317.
- Yániz, J. L., C. Soler, P. Recreo, T. Carretero and A. Bono. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim. Reprod. Sci.* 156: 128-134.
- Zhu, W. and X. Liu. 2000. Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J. Androl.* 2: 135-138.