

Asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado

Association between conventional and computerized sperm quality parameters with flow cytometric evaluation of frozen bovine semen

Elizabeth Varela¹, Mauricio Rojas^{2,3}, Giovanni Restrepo^{4,5}

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado. El semen de 10 eyaculados de cinco toros fue congelado. Se evaluó la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP), la velocidad lineal (VSL), la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad media (VAP) del semen descongelado utilizando el sistema SCA[®]. La morfología normal (MN), la vitalidad del esperma (VE) y la integridad funcional de la membrana se evaluaron mediante la tinción con eosina-nigrosina y la prueba hipoosmótica (HOST). El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$) y la estabilidad de la membrana se evaluaron por citometría de flujo a través de las sondas DiOC6(3)/PI y M-540/Yopro-1, respectivamente. Se calcularon coeficientes de correlación de Pearson y se ajustaron modelos de regresión lineal múltiple ($p < 0.05$). Se hallaron correlaciones positivas entre $\Delta\psi M$ -Alto y $\Delta\psi M$ -Medio con diferentes parámetros de calidad seminal ($p < 0.05$). Así mismo, se encontraron coeficientes de correlación positivos entre la población de espermatozoides no-criocapacitados no-apoptóticos (M-Y-) y todos los parámetros

¹ Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Antioquia, Colombia

² Grupo Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Unidad de Citometría de Flujo, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Antioquia, Colombia

⁵ E-mail: grestre0@unal.edu.co

Recibido: 19 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 14 de abril de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

evaluados ($p < 0.05$). La mayoría de los coeficientes de regresión para las poblaciones de espermatozoides con mayor $\Delta\psi M$ y estabilidad de membrana, indicaron incrementos significativos en la calidad del semen congelado-descongelado ($p < 0.05$). Se concluye que la actividad mitocondrial y la estabilidad de membrana evaluadas por citometría de flujo, están asociadas con la calidad espermática estimada por métodos convencionales y computarizados, en el semen bovino criopreservado.

Palabras clave: apoptosis, calidad seminal, criocapacitación, correlación, mitocondria

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the association between conventional and computerized parameters of seminal quality by flow cytometry of frozen bovine semen. Semen of 10 ejaculates from five bulls was frozen. Total motility (TM), progressive motility (PM), linear velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and average path velocity (VAP) in thawed semen were evaluated using the SCA[®] system. Normal morphology (NM), sperm vitality (SV) and functional membrane integrity were assessed by the eosin-nigrosin stain and the hypoosmotic test (HOST). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi M$) and membrane stability were assessed by flow cytometry through the DiOC6(3)/PI and M-540/Yopro-1 dyes, respectively. Pearson correlation coefficients were calculated, and multiple linear regression models were adjusted ($p < 0.05$). Positive correlations between High- $\Delta\psi M$ and Medium- $\Delta\psi M$ with different conventional and computerized parameters of seminal quality were found ($p < 0.05$). Likewise, positive correlation coefficients between the non-cryocapacitated non-apoptotic sperm population (M-Y-) and all the conventional and computerized parameters were found ($p < 0.05$). Most regression coefficients for sperm populations with higher $\Delta\psi M$ and membrane stability indicated significant increases in the quality of frozen-thawed semen ($p < 0.05$). It is concluded that mitochondrial activity and membrane stability evaluated by flow cytometry are associated with the sperm quality estimated by conventional and computerized methods in cryopreserved bovine semen.

Key words: apoptosis, sperm quality, cryocapacitation, correlation, mitochondria

INTRODUCCIÓN

En toros se ha observado que la movilidad evaluada subjetivamente y mediante sistemas computarizados de análisis espermático (CASA), así como la incidencia de espermatozoides vivos, se correlacionan positivamente con la fertilidad en campo (Januskauskas *et al.*, 2003). Así mismo, se reportan correlaciones positivas entre diversos métodos para la evaluación de espermatozoides con plasmalema intacto, entre los cuales, se conoce que el ensayo hypoosmótico (HOST)

contribuye con la predicción de la tasa de fertilización *in vitro* (Brito *et al.*, 2003).

Además de los métodos convencionales de evaluación seminal, el análisis espermático por citometría de flujo es considerado como método objetivo, preciso y de alto grado de confiabilidad. Esta técnica mide de manera imparcial la cantidad de tinción fluorescente asociada con las células e incluso permite evaluar múltiples tinciones en espermatozoides individuales (Graham, 2001). La evaluación de un alto número de espermatozoides por muestra en este análisis per-

mite que los datos obtenidos muestren una menor variabilidad intra-análisis y, por lo tanto, son más repetibles (Kirk *et al.*, 2005; Mocé y Graham, 2008). Sellem *et al.* (2015) encontraron que varios parámetros de calidad del semen bovino descongelado, evaluados mediante CASA y citometría de flujo, estaban correlacionados con la fertilidad basada en la tasa de no retorno a los 56 días después de la inseminación.

Otras asociaciones interesantes son las resultantes entre los métodos convencionales de evaluación seminal, el uso de sistemas computarizados y los parámetros evaluados por citometría de flujo, toda vez que podrían favorecer la estimación de fertilidad potencial de las muestras de semen, sin requerir la evaluación de la fertilidad a través de tasas de no retorno, confirmación ecográfica de la preñez o el nacimiento de crías vivas. Mediante evaluaciones fluorométricas y por citometría de flujo de semen bovino criopreservado se ha podido establecer correlaciones entre la actividad mitocondrial, la viabilidad, la movilidad progresiva y la integridad del acrosoma, con mediciones microscópicas de la movilidad espermática y el estado acrosomal (Garner *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Gürler *et al.*, 2016). Así mismo, Kirk *et al.* (2005) hallaron correlaciones positivas ($r > 0.50$) entre la movilidad visual y por CASA con los resultados por citometría de flujo de espermatozoides viables, viables con acrosomas intactos y con alto potencial de membrana mitocondrial, logrando ajustar modelos altamente predictivos del potencial fertilizante de las muestras de semen equino criopreservado.

Se ha descrito que la criopreservación del semen bovino induce fenómenos característicos de la apoptosis, como son la disminución del potencial de membrana mitocondrial, la activación de las caspasas y el aumento de la permeabilidad de la membrana, los cuales estarían implicadas en la disminución de la movilidad celular, y en alteraciones de la regulación del ciclo celular, la diferen-

ciación celular, la capacitación y las reacciones acrosómicas (Martin *et al.*, 2004). A pesar de esto, existe información limitada respecto a las posibles asociaciones existentes entre diferentes parámetros convencionales y por sistemas computarizados de calidad seminal, con la evaluación por citometría de flujo de alteraciones generadas por la criopreservación como la apoptosis, la criocapacitación y la vitalidad espermática. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se obtuvieron 10 eyaculados de cinco toros sanos y sexualmente maduros, de las razas Angus y Holstein, ubicados en el departamento de Antioquia, Colombia. Los toros se mantuvieron bajo condiciones controladas de manejo y alimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación con Animales del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.

Colecta y Evaluación Seminal

Las muestras de semen se colectaron una vez por semana durante un periodo de 10 semanas consecutivas, mediante el uso de un electroeyaculador (Electrojac 6, USA). El toro fue inmovilizado en un brete, se indujo la micción, se cortó el pelo del prepucio y se le lavó con una solución salina y se vació el contenido rectal. El voltaje del electroeyaculador aumentó automáticamente durante su empleo (Baiee *et al.*, 2018).

El eyaculado se recogió en una bolsa de plástico estéril, se estimó su movilidad masal e individual mediante un microscopio de contraste de fases (Eclipse E200, Nikon,

Japón) y se evaluó su concentración mediante un espectrofotómetro (Spermacue®, Minitube, Alemania). Los requerimientos mínimos de calidad seminal para procesar los eyaculados fueron de 70% de movilidad y una concentración espermática de 500×10^6 espermatozoides/ml (Khumran *et al.*, 2015).

Criopreservación Seminal

Las muestras de semen se diluyeron a una concentración de 60×10^6 espermatozoides/ml con el diluyente Trilady1® (Minitube, Alemania), el cual fue previamente preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Luego, cada muestra se introdujo en un dispositivo de transporte a 4 °C (Equitainer, Hamilton Biovet, USA), donde permanecieron durante dos horas. Una vez en el laboratorio, las muestras de semen fueron equilibradas durante una hora en un refrigerador a 4 °C, se empacaron en pajillas de 0.25 ml (IMV, Francia) y se sellaron con alcohol polivinílico (Merck, Alemania). Posteriormente, las pajillas se sometieron a vapores de nitrógeno líquido (LN₂), al colocarlas durante 15 minutos en un rack, a una distancia de 4 cm por encima de la superficie del LN₂ y finalmente se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. Las pajillas fueron descongeladas en agua a 37 °C durante 1 minuto luego de una semana de almacenamiento.

Calidad Espermática

Se evaluó la movilidad y la cinética de los espermatozoides mediante el software Sperm Class Analyzer (SCA®, Microptic, España). Se colocó una gota de semen descongelado en un portaobjetos precalentado a 37 °C y se cubrió con un cubreobjetos. En un microscopio de contraste de fases (Eclipse E200, Nikon Inc., Japón) se analizaron un mínimo de 500 espermatozoides por muestra, para determinar la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP), la velocidad lineal (VSL), la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad media (VAP).

La vitalidad espermática (VE) y la morfología normal (MN) se evaluaron utilizando la tinción de eosina y nigrosina. Una gota de 20 µl de semen descongelado se mezcló sobre un portaobjetos con 20 µl de eosina-nigrosina (Merck, Alemania) durante 15 segundos y se dejó secar sobre una placa térmica a 37 °C. Se evaluaron 200 espermatozoides para cada prueba utilizando un microscopio de contraste de fases (Eclipse E200, Nikon, Japón). Los espermatozoides con cabezas no teñidas se consideraron vivos y los espermatozoides con cabezas rosadas se clasificaron como muertos (Khumran *et al.*, 2015). Los espermatozoides se clasificaron, asimismo, según su morfología normal o anormal (Nagy *et al.*, 2013).

La integridad funcional de la membrana plasmática se evaluó mediante la prueba hipoosmótica (HOST) (Rekha *et al.*, 2016). Se mezclaron 50 µl de semen descongelado con 200 µl de una solución hipoosmótica (5.4% de sacarosa, 100 mOsmol/l) y se colocó a incubación a 37 °C durante 40 minutos. Se realizó el conteo de 200 espermatozoides mediante microscopía (Eclipse E200, Nikon, Japón). Los espermatozoides que reaccionaron con el enrollamiento de la cola se consideraron como células con membranas funcionalmente intactas (Baiee *et al.*, 2018).

Citometría de Flujo

La criocapacitación y la apoptosis de los espermatozoides congelados-descongelados se evaluaron mediante las sondas fluorescentes Merocianina 540 / Yo-Pro-1 (Thermo Fisher Scientific, USA). Se prepararon soluciones stock de Merocianina 540 en DMSO (1 mM) y Yo-Pro-1 en DMSO (25 µM). Se tomaron 10 µl de semen diluido y se agregaron ambas sondas en concentraciones finales de 2.7 µM de Merocianina 540 y 25 nM de Yo-Pro-1 (Kavak *et al.*, 2003). Las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos a 37 °C. Se evaluaron usando un citómetro de flujo (LSR Fortessa, BD Biosciences, USA), en un rango de emisión

entre 500-550 nm para Yo-Pro-1 y 580-620 nm para Merocianina 540. Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo v. 7.6.2 (FlowJo, USA).

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$) de los espermatozoides se evaluó con una versión adaptada del protocolo descrito por Zamzami *et al.* (1996). Se usó un tubo de poliestireno para depositar 3.3'- yoduro de dihexiloxacarbocianina (DiOC6(3), Thermo Fisher Scientific, USA) en PBS a una concentración final de 80 nM y 7-aminoactinomicina D (7-AAD, Thermo Fisher Scientific, USA) a una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$. A esta mezcla se agregó 10 μl de semen, dando como volumen final 300 μl .

Posteriormente, para evaluar simultáneamente la viabilidad celular, se añadió 1 mg/ml de yoduro de propidio (PI) (Thermo Fisher Scientific, USA). Se incubó durante 30 minutos y la lectura se hizo mediante citometría de flujo (LSR Fortessa™, BD Biosciences, USA). Las muestras se excitaron utilizando un láser de fase sólida de 488 nm y se detectó fluorescencia de DiOC6(3) y 7-AAD a 530/30 nm y 630/30 nm, respectivamente. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo v. 7.6.2 (FlowJo, USA).

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de correlación de Pearson (r) y regresión lineal entre las variables convencionales y computarizadas de calidad seminal con las variables espermáticas evaluadas por citometría de flujo. Así mismo, se utilizó un análisis de regresión multivariado para determinar los modelos multi-paramétricos de «mejor ajuste» para estimar la calidad espermática posdescongelación (Mocé y Graham, 2008). Para esto, se calculó el índice de calidad seminal (SQ_i) = $\Sigma Sp/100 n$, donde Sp es cada parámetro seminal y n es el número de parámetros. En

el cálculo del SQ_i se incluyeron los parámetros MT, MP, VE, MN y HOST. Los valores de SQ_i oscilan entre 0 y 1, donde $SQ_i = 1$ representa el nivel máximo de calidad de espermática (Ortiz *et al.*, 2013). Se consideraron como coeficientes de correlación y regresión significativos aquellos con un valor $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron mediante el programa SAS v. 9.2 (SAS, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación de la calidad espermática por métodos convencionales, computarizados y citometría de flujo se presentan en el Cuadro 1. Se evaluaron un mínimo de cinco pajillas de semen congelado-descongelado por eyaculado, con la finalidad de reducir la variabilidad por efecto de la repetición. Se observó entre media y alta variabilidad en la mayoría de los parámetros de calidad seminal, siendo mayor en algunas poblaciones de espermatozoides según el $\Delta\psi M$ y la estabilidad de membrana.

La asociación entre los métodos para la evaluación de la movilidad, la cinética, la morfología y la integridad de membrana de los espermatozoides fue evidente en relación con la evaluación por citometría de flujo de la actividad mitocondrial, la viabilidad y la estabilidad de membrana. La presencia de poblaciones de espermatozoides con un potencial de membrana mitocondrial alto ($\Delta\psi M$ -Alto) se correlacionó de manera positiva y significativa con todos los parámetros de calidad seminal ($p < 0.05$), a excepción de la morfología (Cuadro 2). Por otro lado, se hallaron correlaciones positivas ($p < 0.05$) entre un potencial de membrana mitocondrial medio ($\Delta\psi M$ -Medio) y diferentes parámetros de calidad seminal, mientras en ningún caso se encontró asociación entre un potencial de membrana mitocondrial bajo ($\Delta\psi M$ -bajo) y los parámetros convencionales y computarizados de calidad espermática.

Cuadro 1. Evaluación por métodos convencionales, computarizados y citometría de flujo, de semen bovino criopreservado

Variable	Media	D.E.	Coef. de variación	Error estándar	Mínimo	Máximo
MT (%)	43.6	16.3	37.4	1.8	12.4	89.2
MP (%)	17.0	11.5	67.4	1.3	0.8	53.0
VCL ($\mu\text{m/s}$)	42.1	13.7	32.5	1.5	21.5	81.1
VSL ($\mu\text{m/s}$)	18.1	10.9	60.2	1.2	3.1	50.7
VAP ($\mu\text{m/s}$)	26.8	13.2	49.3	1.5	10.3	65.7
HOST (%)	43.7	14.3	32.8	1.6	15.0	83.0
MN (%)	81.9	22.2	27.1	0.5	66.0	90.0
VE (%)	44.6	15.2	34.2	1.7	18.0	92.0
$\Delta\Psi\text{M}$ -Alto (%)	18.3	15.3	83.5	1.9	0.5	74.0
$\Delta\Psi\text{M}$ -Medio (%)	16.1	23.7	146.8	2.9	0.0	71.8
$\Delta\Psi\text{M}$ -Bajo (%)	4.8	14.6	303.1	1.8	0.0	85.7
No Viables (%)	53.4	26.8	50.1	3.0	0.0	96.9
M+Y- (%)	17.4	24.5	140.8	3.0	0.0	77.2
M+Y+ (%)	51.5	31.9	61.9	4.0	0.0	96.3
M-Y- (%)	18.2	13.8	75.7	1.7	0.3	50.8
M-Y+ (%)	12.9	26.0	201.2	3.2	0.0	91.6

MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad lineal. VAP: velocidad media. MN: morfología normal. VE: vitalidad espermática. HOST: integridad funcional de membrana. $\Delta\Psi\text{M}$ -Alto: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto. $\Delta\Psi\text{M}$ -Medio: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial medio. $\Delta\Psi\text{M}$ -Bajo: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial bajo. M+Y-: espermatozoides criocapitados no-apoptóticos. M+Y+: espermatozoides criocapitados apoptóticos. M-Y-: espermatozoides no-criocapitados no-apoptóticos. M-Y+: espermatozoides no-criocapitados apoptóticos

Thomas *et al.* (1998) encontraron una correlación negativa entre la proporción de mitocondrias con un potencial de membrana mitocondrial bajo (fluorescencia verde) con la movilidad previa a la congelación ($r=-0.81$), y una correlación positiva entre el potencial de membrana mitocondrial alto (fluorescencia rojo-naranja), con la movilidad previa a la congelación ($r=0.60$). Sin embargo, estos investigadores no encontraron correlaciones significativas para ambos niveles de activi-

dad mitocondrial con la movilidad espermática posdescongelación, lo cual difiere con lo encontrado en el presente estudio donde la actividad mitocondrial estuvo claramente asociada con la movilidad y la cinética posdescongelación de los espermatozoides (Cuadro 2). Según Mazur *et al.* (2000), el estado mitocondrial de los espermatozoides es crítico debido a su relación con el estado energético y la movilidad de la célula y, por lo tanto, se ha relacionado con la fertilidad.

Cuadro 2. Coeficientes de correlación (r) entre métodos convencionales, computarizados y por citometría de flujo para la evaluación de semen bovino criopreservado

	MT	MP	VCL	VSL	VAP	MN	VE	HOST
$\Delta\Psi M$ -Alto	0.3663 0.0004	0.4124 <.0001	0.3222 0.0022	0.5058 <.0001	0.4546 <.0001	0.1684 0.1167	0.3499 0.0008	0.4691 <.0001
$\Delta\Psi M$ -Medio	0.2989 0.0047	0.1852 0.0841	0.0545 0.6137	0.0003 0.9978	-0.0035 0.9741	0.5039 <.0001	0.3247 0.0020	0.3419 0.0011
$\Delta\Psi M$ -Bajo	-0.0068 0.9496	0.0224 0.8355	0.0174 0.8720	0.0184 0.8645	0.0350 0.7457	-0.0367 0.7340	0.0172 0.8734	-0.0343 0.751
No Viabiles	-0.3706 0.0001	-0.2464 0.0125	-0.0832 0.4056	-0.1641 0.0993	-0.1529 0.1248	-0.4693 <.0001	-0.4138 <.0001	-0.4619 <.0001
M+Y-	0.2142 0.0476	0.0936 0.3910	-0.0090 0.9342	-0.0227 0.8350	-0.0404 0.7116	0.3722 0.0004	0.2308 0.0325	0.3414 0.0013
M+Y+	-0.3520 0.0009	-0.3171 0.0029	-0.2029 0.0609	-0.2394 0.0264	-0.2473 0.0217	-0.4713 <.0001	-0.3765 0.0004	-0.3464 0.0011
M-Y-	0.3399 0.0014	0.3878 0.0002	0.2580 0.0165	0.3984 0.0001	0.3668 0.0005	0.2877 0.0072	0.3589 0.0007	0.2835 0.0082
M-Y+	0.0845 0.4390	0.1299 0.2332	0.1474 0.1754	0.1325 0.2237	0.1795 0.0980	0.1225 0.2608	0.0912 0.4032	-0.0202 0.8534

Los resultados se presentan como coeficiente de correlación (arriba), valor p (abajo). MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad lineal. VAP: velocidad media. MN: morfología normal. VE: vitalidad espermática. HOST: integridad funcional de membrana. $\Delta\Psi M$ -Alto: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto. $\Delta\Psi M$ -Medio: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial medio. $\Delta\Psi M$ -Bajo: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial bajo. M+Y-: espermatozoides criocapacitados no-apoptóticos. M+Y+: espermatozoides criocapacitados apoptóticos. M-Y-: espermatozoides no-criocapacitados no-apoptóticos. M-Y+: espermatozoides no-criocapacitados apoptóticos

Como era de esperarse, la presencia de células no viables se correlacionó negativamente con los indicadores de calidad seminal (Cuadro 2), aunque no se halló significancia para las variables de cinética espermática (VCL, VSL y VAP). Esto es acorde con lo reportado por Gürler *et al.* (2016), quienes aplicaron modelos polinomiales a los resultados de calidad de semen bovino incubado por 24 horas después de la congelación y descongelación, y hallaron coeficientes negati-

vos simultáneamente para la movilidad progresiva, la integridad de membrana y del acrosoma y la actividad mitocondrial alta, demostrando un efecto adverso de la criopreservación sobre la viabilidad de los espermatozoides.

Los coeficientes de regresión estimados entre los niveles de actividad mitocondrial y los parámetros de calidad seminal coincidieron en la mayoría de los casos con las co-

Cuadro 3. Análisis de regresión entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la actividad mitocondrial de semen bovino criopreservado

Variable	β_0 (Intercepto)	β_1 ($\Delta\Psi M$ -Alto)	β_2 ($\Delta\Psi M$ -Medio)	β_3 ($\Delta\Psi M$ -Bajo)	r^2
MT	25.77	0.55*	0.33*	0.11	0.27
MP	6.35	0.39*	0.15*	0.09	0.25
VCL	32.86	0.41*	0.09	0.08	0.13
VSL	8.64	0.42*	0.05	0.07	0.27
VAP	15.88	0.47*	0.06	0.10	0.22
MN	77.44	0.09*	0.13*	0.02	0.32
VE	27.08	0.51*	0.33*	0.14	0.29
HOST	25.80	0.62*	0.34*	0.09	0.41

* Coeficientes de regresión significativos ($p < 0.05$)

MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad lineal. VAP: velocidad media. MN: morfología normal. VE: vitalidad espermática. HOST: integridad funcional de membrana. $\Delta\Psi M$ -Alto: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto. $\Delta\Psi M$ -Medio: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial medio. $\Delta\Psi M$ -Bajo: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial bajo. r^2 : coeficiente de determinación del modelo de regresión

relaciones encontradas entre estos, mostrando incrementos significativos en cada parámetro de calidad seminal ante el incremento dado en la población de espermatozoides con $\Delta\Psi M$ -Medio y $\Delta\Psi M$ -Alto ($p < 0.05$) (Cuadro 3). Forero-Gonzalez *et al.* (2012) reportaron correlaciones positivas entre la movilidad y la función mitocondrial ($r = 0.66$) y entre la membrana plasmática intacta y la función mitocondrial ($r > 0.90$) de semen bovino criopreservado de forma convencional o automatizada.

Se observó una clara asociación entre las poblaciones de espermatozoides según su estabilidad de membrana con los parámetros convencionales de calidad seminal. Se encontraron coeficientes de correlación positivos entre la población de espermatozoides no-

criocapitados no-apoptóticos (M-Y-) y todos los parámetros convencionales y computarizados evaluados ($p < 0.05$) (Cuadro 2). Así mismo, se hallaron coeficientes de regresión significativos entre dicha población y los distintos parámetros de calidad seminal ($p < 0.05$) (Cuadro 4), demostrando incrementos significativos en la calidad del semen congelado-descongelado en la medida que se logra una mayor conservación de la estabilidad de membrana plasmática.

Consecuentemente, la población de espermatozoides criocapitados apoptóticos (M+Y+) presentó correlaciones negativas para la mayoría de los parámetros ($p < 0.05$), mostrando la reducción general de la calidad espermática por la disminución en la estabilidad de la membrana plasmática (Cuadro 2).

Cuadro 4. Análisis de regresión entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la estabilidad de membrana (criocapacitación / apoptosis) de semen bovino criopreservado

Variable	β_0 (Intercepto)	β_1 (M+Y-)	β_2 (M+Y+)	β_3 (M-Y-)	β_4 (M-Y+)	r^2
MT	28.56	0.22*	-0.01	0.54*	0.06	0.21
MP	9.15	0.08	-0.01	0.37*	0.06	0.18
VCL	40.61	-0.01	-0.06	0.26	0.11	0.08
VSL	10.72	0.03	-0.00	0.36*	0.06	0.16
VAP	22.15	-0.01	-0.04	0.34*	0.11	0.14
MN	79.42	0.08*	-0.02	0.12*	-0.02	0.30
VE	29.51	0.23*	-0.02	0.54*	0.06	0.23
HOST	24.67	0.33*	0.03	0.53*	-0.01	0.26

* Coeficientes de regresión significativos ($p < 0.05$)

MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: velocidad curvilínea. VSL: velocidad lineal. VAP: velocidad media. MN: morfología anormal. VE: vitalidad espermática. HOST: integridad funcional de membrana. M+Y-: espermatozoides criocapacitados no-apoptóticos. M+Y+: espermatozoides criocapacitados apoptóticos. M-Y-: espermatozoides no-criocapacitados no-apoptóticos. M-Y+: espermatozoides no-criocapacitados apoptóticos. r^2 : coeficiente de determinación del modelo de regresión

A pesar de esto, los coeficientes de regresión estimados para dicha población no fueron significativos. Por otro lado, se hallaron coeficientes de regresión positivos entre la población de espermatozoides criocapacitados no-apoptóticos (M+Y-) con MT, MN, VE y HOST ($p < 0.05$), mostrando que la reducción en la presentación del proceso de apoptosis de los espermatozoides criopreservados influye positivamente en la calidad posdescongelación de las muestras de semen.

Al respecto, se sabe que la funcionalidad mitocondrial también puede ser necesaria para la capacitación del esperma, dado que, se ha observado un pico en el consumo de oxígeno durante la capacitación *in vitro* y la reacción acrosómica inducida por la progesterona en espermatozoides bovinos y porcinos (Cordoba *et al.*, 2006, Ramio-Lluch

et al., 2011). Además, está bien establecido que varias proteínas mitocondriales de los espermatozoides se someten a la fosforilación de la tirosina dependiente de la capacitación (Shivaji *et al.*, 2009). Por otro lado, fenómenos similares a la apoptosis como la disminución de la viabilidad, movilidad y $\Delta\psi M$, así como aumentos en el daño al ADN, defectos de morfología y peroxidación de lípidos, se han asociado al exceso de especies reactivas de oxígeno y al desequilibrio en las defensas antioxidantes disponibles (Amaral *et al.*, 2013). En el semen bovino se han reportado cambios similares a la apoptosis por efecto de la criopreservación (Martin *et al.*, 2004).

No obstante que diferentes autores no han encontrado relación entre los niveles de apoptosis del semen bovino criopreservado y la fertilidad en campo (Anzar *et al.*, 2002,

Cuadro 5. Mejores modelos de regresión para la calidad seminal del semen criopreservado bovino con relación a la evaluación por citometría de flujo de la estabilidad de membrana y la actividad mitocondrial

Modelos de regresión según el número de variables	r ²
Una variable	
SQi = 0.521 - 0.0015 (M+Y+)	0.15
SQi = 0.373 + 0.0036 ($\Delta\Psi M$ -Alto)	0.17
Dos variables	
SQi = 0.534 + 0.0023 ($\Delta\Psi M$ -Alto) - 0.0021 (No viables)	0.33
SQi = 0.331 + 0.0042 ($\Delta\Psi M$ -Alto) + 0.0025 ($\Delta\Psi M$ -Medio)	0.35
Tres variables	
SQi = 0.326 + 0.0048 ($\Delta\Psi M$ -Alto) + 0.0034 ($\Delta\Psi M$ -Medio) - 0.0011 (M+Y-)	0.37
SQi = 0.318 + 0.0040 ($\Delta\Psi M$ -Alto) + 0.0026 ($\Delta\Psi M$ -Medio) + 0.0064 ($\Delta\Psi M$ -Bajo)	0.38
Cuatro variables	
SQi = 0.313 + 0.0046 ($\Delta\Psi M$ -Alto) + 0.0034 ($\Delta\Psi M$ -Medio) + 0.0062 ($\Delta\Psi M$ -Bajo) - 0.0010 (M+Y-)	0.39
SQi = 0.305 + 0.0034 ($\Delta\Psi M$ -Alto) + 0.0026 ($\Delta\Psi M$ -Medio) + 0.0064 ($\Delta\Psi M$ -Bajo) + 0.0015 (M-Y-)	0.40

SQi: índice de calidad seminal. r²: coeficiente de determinación del modelo de regresión
 $\Delta\Psi M$ -Alto: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial alto. $\Delta\Psi M$ -Medio: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial medio. $\Delta\Psi M$ -Bajo: espermatozoides con potencial de membrana mitocondrial bajo. M+Y-: espermatozoides criocapacitados no-apoptóticos. M+Y+: espermatozoides criocapacitados apoptóticos. M-Y-: espermatozoides no-criocapacitados no-apoptóticos

Dogan *et al.*, 2013), un estudio reciente demostró como tanto el estado de apoptosis, como otros indicadores de la pérdida de la estabilidad de membrana y la viabilidad del semen criopreservado de búfalo están correlacionados negativamente con la fertilidad en campo (Singh *et al.*, 2016). Así mismo, se han establecido modelos de regresión altamente predictivos de la fertilidad del semen bovino, mediante la inclusión de diferentes parámetros de calidad seminal (Kirk *et al.*, 2005; Mocé y Graham, 2008). En la presente investigación se construyeron modelos de regresión a partir de los parámetros deriva-

dos de las evaluaciones por citometría de flujo, empleando el índice de calidad seminal (SQi) como variable dependiente.

El Cuadro 5 presenta los mejores modelos de regresión para el SQi, según el número de variables incluidas a partir de la evaluación por citometría de flujo de la estabilidad de membrana y la actividad mitocondrial. Para el SQi del semen criopreservado se encontró un valor promedio de 0.43 ± 0.12 (media \pm DE), cuyos resultados estuvieron en un rango entre 0.21 y 0.80. Los máximos coeficientes de determinación (r²), se alcanzaron

en los modelos de cuatro variables, donde se incluyeron todas las poblaciones de espermatozoides según su potencial de membrana mitocondrial y alguna de las poblaciones con espermatozoides no-apoptóticos del análisis de estabilidad de membrana. Lo anterior, muestra como la actividad mitocondrial y el estado de apoptosis aportan de forma importante a la calidad seminal, y deja abierta la posibilidad de incluir otros parámetros evaluados por citometría de flujo en modelos de regresión, con la finalidad de incrementar la predictibilidad de la fertilidad potencial del semen bovino criopreservado.

CONCLUSIONES

- El potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides derivado de la evaluación por citometría de flujo se encuentra altamente asociado con la calidad espermática estimada por métodos convencionales y computarizados en el semen bovino congelado-descongelado. El semen con alto potencial de membrana mitocondrial tiende a presentar resultados favorables en la movilidad, la cinética, la morfología, la vitalidad y la integridad funcional de membrana plasmática.
- La estabilidad de membrana derivada de la evaluación por citometría de flujo de la criocapacitación y la apoptosis de los espermatozoides se encuentra altamente asociada con la calidad espermática estimada por métodos convencionales y computarizados, en el semen bovino congelado-descongelado. La población de espermatozoides no-criocapacitados no-apoptóticos tiende a presentar resultados favorables en la movilidad, la cinética, la morfología, la vitalidad y la integridad funcional de membrana plasmática.

Agradecimientos

Al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por la financiación de esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. **Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. 2013.** Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146: 163-174. doi: 10.1530/REP-13-0178
2. **Anzar M, He L, Buhr M, Kroetsch T, Pauls K. 2002.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 66: 354-360. doi: 10.1095/biolreprod66.2.354
3. **Baiee FH, Wahid H, Rosnina Y, Ariff O, Yimer N, Jeber Z, Salman H, et al. 2018.** Impact of *Eurycoma longifolia* extract on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in chilled and cryopreserved bull sperm. *Cryobiology* 80: 43-50. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.12.006
4. **Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. 2003.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology* 60: 1539-1551. doi: 10.1016/S0093-691X-(03)00174-2
5. **Cordoba M, Mora N, Beconi MT. 2006.** Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology* 65: 882-892. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.06.015
6. **Dogan S, Mason M, Govindaraju A, Belser L, Kaya A, Stokes J, Rowe D, et al. 2013.** Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. *J Reprod Develop* 59: 18-26. doi: 10.1262/jrd.2012-068
7. **Forero-Gonzalez RA, Celeghini EC, Raphael CF, Andrade AF, Bressan FF, Arruda RP. 2012.** Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 44: 154-159. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x

8. **Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. 1997.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 57: 1401-1406. doi: 10.1095/biolreprod57.-6.1401
9. **Graham JK. 2001.** Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 68: 239-247. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00160-9
10. **Gürler H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic J, Bollwein H. 2016.** Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology* 86: 562-571. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.007
11. **Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2003.** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60: 743-758. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00050-5
12. **Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. 2003.** Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 76: 205-216. doi: 10.1016/S0378-4320(02)-00247-6
13. **Khumran AM, Yimer N, Rosnina Y, Ariff MO, Wahid H, Kaka A, Ebrahimi M, et al. 2015.** Butylated hydroxy-toluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen-thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk based extenders. *Anim Reprod Sci* 163: 128-134. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2015.10.007
14. **Kirk ES, Squires EL, Graham JK. 2005.** Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1422-1439. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2005.03.006
15. **Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2004.** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71: 28-37. doi: 10.1095/biolreprod.103.024281
16. **Mazur P, Katkov II, Katkova N, Critser JK. 2000.** The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 40: 187-209. doi: 10.1006/cryo.2000.2238
17. **Mocé E, Graham JK. 2008.** *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 105: 104-118. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.016
18. **Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H. 2013.** Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology* 79: 1153-1161. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2013.02.011.
19. **Ortiz I, Dorado J, Acha D, Gálvez M, Urbano M, Hidalgo M. 2013.** Colloid single layer centrifugation improves post thaw donkey (*Equus asinus*) sperm quality and is related to ejaculate freezability. *Reprod Fert Develop* 27: 332-340. doi: 10.1071/RD13246
20. **Ramio-Lluch L, Fernandez-Novell JM, Pena A, Colas C, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Ramirez A, et al. 2011.** 'In vitro' capacitation and acrosome reaction are concomitant with specific changes in mitochondrial activity in boar sperm: evidence for a nucleated mitochondrial activation and for the existence of a capacitation-sensitive subpopulational structure. *Reprod Domest Anim* 46: 664-673. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01725.x
21. **Rekha A, Zohara B, Bari FY, Alam MS. 2016.** Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of

- frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). *Small Ruminant Res* 134: 39-43. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.12.007
22. **Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EP. 2015.** Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84: 1447-1454. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.035
23. **Shivaji S, Kota V, Siva AB. 2009.** The role of mitochondrial proteins in sperm-capacitation. *J Reprod Immunol* 8: 314-318. doi:10.1016/j.jri.2009.08.009
24. **Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1998.** Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58: 786-793. doi: 10.1095/biolreprod58.3.786
25. **Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. 1996.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183: 1533-1544. doi: 10.1084/jem.183.4.1533