



Las subpoblaciones de espermatozoides y su calidad en fracciones producidas por la centrifugación de una sola capa en muestras frescas y normospérmicas de esperma de cordero



Carlos Carmelo Pérez-Marín ^a

Ander Arando ^{b*}

Francisco Maroto-Molina ^c

Alberto Marín ^a

Juan Vicente Delgado ^b

^a Universidad de Córdoba. Department of Animal Medicine and Surgery, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid-Cádiz km 396, Córdoba, 14014, Spain.

^b Universidad de Córdoba. Department of Genetics, Córdoba, Spain.

^c Universidad de Córdoba, Department of Animal Production. Córdoba, Spain.

*Autor de correspondencia: anderarando@hotmail.com

Resumen:

La técnica de centrifugación de una sola capa (SLC) ha sido desarrollada para seleccionar la mejor población de espermatozoides en un eyaculado con la finalidad de aumentar las tasas de fertilización mediante la inseminación artificial o fertilización *in vitro*. Se procesaron muestras normospérmicas de semen de carnero que contenían 800 y 3000 × 10⁶ espermatozoides/ml (C800 y C3000, respectivamente) utilizando SLC. Se separaron tres fracciones de espermatozoides en cada muestra y se analizó el rendimiento, la calidad y las subpoblaciones de espermatozoides en cada una. En las muestras de C800, la tasa de recuperación de espermatozoides no varió entre las fracciones. Sin embargo, en las C3000, la fracción superior (F1) contenía más espermatozoides que la fracción inferior (F3). La F1 en las C3000 tenía un porcentaje mayor de espermatozoides (53.2 %) que, en las C800, mientras que en la F2 de las C3000 el porcentaje de espermatozoides recuperados fue menor (25.2 %) que en la F2 de las C800 (45.4 %). Aplicando los parámetros de motilidad de los espermatozoides se identificaron tres subpoblaciones de

espermatozoides: SP1, de baja velocidad y sin movimiento progresivo (19.1 %); SP2, rápidos y progresivos (43.7 %); y SP3, rápidos, pero con movimiento no lineal (37.2 %). Si bien SLC se ha utilizado para la separación de espermatozoides en muestras de semen subóptimas y/o de baja concentración de espermatozoides, los resultados indican que SLC no es eficiente en la separación de diferentes poblaciones de espermatozoides en muestras normospermicas de semen de carnero con altas concentraciones de espermatozoides.

Palabras clave: Centrifugación de una sola capa, Eyaculados, Ovinos, Espermatozoides.

Recibido:08/05/2020

Aceptado:26/08/2020

Introducción

La motilidad es una característica importante relacionada con el avance de los espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo femenino⁽¹⁾ y a su penetración en los ovocitos. La evaluación de la motilidad es esencial en la evaluación de la calidad del semen y la potencial fertilidad masculina⁽²⁾. Se sabe que los eyaculados de los mamíferos están constituidos por un conjunto de células heterogéneas, más varias subpoblaciones de espermatozoides. Con el fin de seleccionar los mejores espermatozoides se han desarrollado muchos procedimientos para reducir la cantidad de residuos, células no espermatozoides y bacterias en las muestras de semen, así como para eliminar el plasma seminal y así evitar el proceso de la capacitación temprana⁽³⁾. Este procesamiento del eyaculado pueda mejorar los resultados de la inseminación artificial (IA) y es fundamental en la implementación de otros procedimientos biotecnológicos, como la producción *in vitro* y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (intracytoplasmatic sperm injection – ICSI)⁽⁴⁾. En numerosas especies, Percoll, el cual consiste en partículas de sílice recubiertas de polivinilpirrolidona, fue uno de los coloides más utilizados en la separación de los espermatozoides⁽⁵⁻⁷⁾. Sin embargo, su uso se ha reducido en respuesta a la detección de endotoxinas que ejercen un efecto negativo sobre los espermatozoides. Para superar las deficiencias del Percoll se han diseñado nuevos medios. Los coloides de sílice recubiertos de silano son actualmente las soluciones más utilizadas, ya que se ha demostrado que son más estables y estandarizadas⁽⁸⁾. Estos coloides se emplean en una variedad de procedimientos, como la centrifugación de doble capa (double-layer centrifugation - DLC) o en una simplificación de esta técnica llamada centrifugación de una sola capa (single-layer centrifugation - SLC)⁽⁹⁾.

El volumen de una muestra de semen y su concentración de espermatozoides puede afectar la eficacia de estos procedimientos⁽¹⁰⁾. En este contexto, DLC se considera poco práctica como medio para procesar eyaculados completos destinados a la IA⁽⁹⁾. Está indicado para los eyaculados oligospermicos, pero no para las muestras normospermicas completas. Una técnica más fácil es SLC, lo cual requiere menos tiempo y se ha utilizado

ampliamente en equinos⁽¹¹⁾. Hay pocos informes sobre su uso en otras especies. Los estudios llevados a cabo en toros han mostrado que los espermatozoides seleccionados por SLC exhiben un aumento en la integridad de la cromatina del esperma⁽¹²⁾ y un alto potencial de membrana mitocondrial, aunque aumenta la producción de superóxido⁽¹³⁾. Sin embargo, esta técnica solo mejora la motilidad de los espermatozoides cuando se procesan muestras de semen de baja calidad⁽¹⁴⁾. Una comparación entre las fracciones obtenidas por la centrifugación coloidal del semen humano muestra que los espermatozoides aislados en el sedimento inferior mostraban una menor fragmentación del ADN espermático, aunque su longevidad era menor que la del semen puro⁽¹⁵⁾. Estos hallazgos sugieren que se debe de llevar a cabo un análisis más profundo a las fracciones de espermatozoides obtenidas mediante diferentes procedimientos de enriquecimiento o separación de espermatozoides con el fin de determinar su eficiencia en términos de la viabilidad, la concentración y otros variables.

Los eyaculados que contienen una alta concentración de espermatozoides (por ejemplo, los de los rumiantes) dificulta el uso de las técnicas de centrifugación en capas para procesar eyaculados enteros⁽¹⁰⁾. Muy pocos estudios han evaluado el efecto de la separación coloidal en el eyaculado fresco, entero y normospermico de carnero. En este trabajo se utilizaron muestras de semen de carnero que contenían diferentes concentraciones de espermatozoides. El objetivo fue cuantificar la tasa de recuperación de espermatozoides y su calidad, así como la distribución de las diferentes subpoblaciones de espermatozoides móviles en cada fracción del semen después de la separación por SLC.

Material y métodos

Animales y colecta de semen

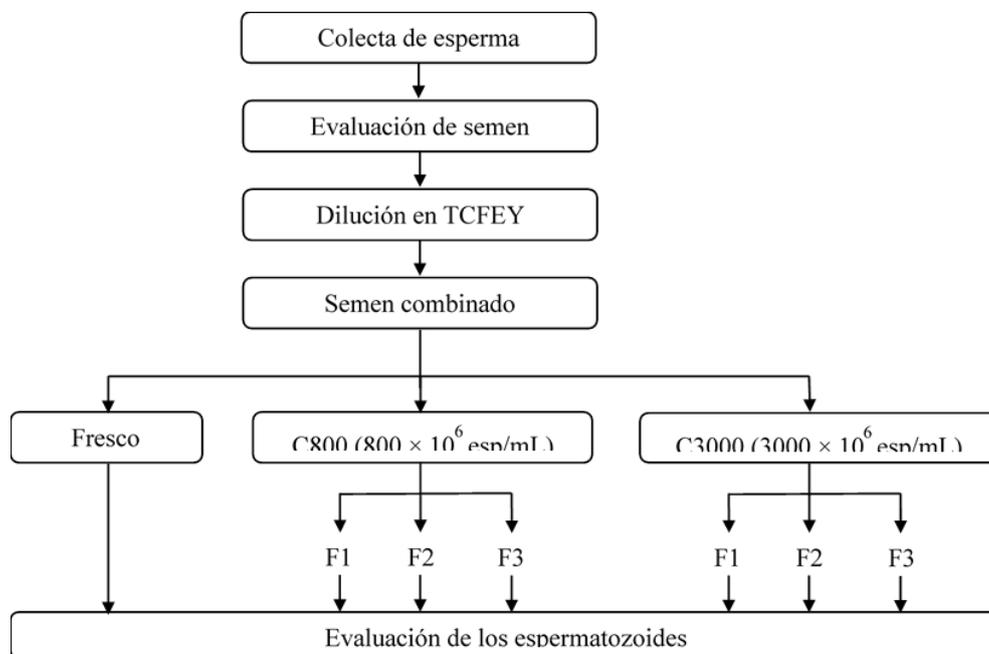
Para este estudio se utilizaron cuatro carneros maduros de la raza Merino de entre 3 y 5 años de edad. Los animales se alojaron en corrales individuales ubicados en la Diputación de Córdoba (España). Se alimentaron con un concentrado comercial (0.5 kg/día), heno de alfalfa, agua y minerales. Se tomaron muestras de semen una vez a la semana durante la temporada de no reproducción (marzo-junio) mediante una vagina artificial con una oveja como celadora. Los eyaculados se mantuvieron a 37 °C y se cuantificaron la motilidad de la masa (utilizando una escala de 1 a 5; aumento de 40×; Olympus, Tokio, Japón), la concentración de espermatozoides (Accuread, Tecnologías IMV, Francia) y el volumen del eyaculado. Se utilizaron los eyaculados con una motilidad de masa ≥ 4 , una concentración $\geq 3000 \times 10^6$ espermatozoides/ml y una motilidad individual ≥ 70 %.

Todos los experimentos se autorizaron por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba (n. 2018PI / 29) y se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento Español de Protección Animal (RD 53/2013), tal y como establece el Reglamento UE 2010/63.

Diseño experimental

Después de su evaluación, los eyaculados de los cuatro carneros se diluyeron (1:2) con el diluyente TCFEY: Tris (33.19 g/L), fructosa (9.55 g/L), 10% de yema de huevo clarificada, ácido cítrico (17.29 g/L), penicilina G (4 g/L) y estreptomicina (3 g/L). Se combinaron en agua bidestilada, se tomaron dos alícuotas de semen y se colocaron en tubos cónicos para centrifugación (300 xg durante 20 min) (Figura 1). Después de eliminar el sobrenadante, se añadió TCFEY hasta alcanzar una concentración final de 800×10^6 espermatozoides/ml (C800) y 3000×10^6 espermatozoides/ml (C3000). La calidad de los espermatozoides se evaluó en cada concentración.

Figura 1: Diseño experimental para la evaluación de la calidad de los espermatozoides y las subpoblaciones en las diferentes fracciones producidos por SLC de muestras con concentraciones de 800 y 3000×10^6 esp/ml (C800 and C3000).



Se preparó SLC a base de sílice recubierta de silano (BoviPure y BoviDilute, Nidacon, Suecia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aunque estas soluciones se desarrollaron para el esperma de toro, se pueden usar también para los pequeños rumiantes. En resumen, se colocó una capa de 1.5 ml de BoviPure al 80% (v/v) en un tubo cónico de 15 ml. En la parte superior se colocó una capa de una muestra de semen de C800 o C3000 y se centrifugó a 300 xg por 20 min. Se descartó el plasma seminal (aprox. 1.5 ml) y se aislaron tres fracciones distintas por muestra: la superior (F1), la media (F2) y la inferior (F3). Cada fracción tenía un volumen de aproximadamente 0.5 ml. Se extrajeron utilizando pipetas Pasteur en movimientos circulares. En cada fracción de cada muestra se cuantificó la tasa de recuperación de espermatozoides (TRE), su calidad (la motilidad, concentración, viabilidad, morfología y funcionalidad de la

membrana del esperma) y las subpoblaciones de ellos. Se replicó el experimento seis veces utilizando un total de 24 eyaculados.

Tasa de recuperación de los espermatozoides

Se diluyeron las muestras a 1:200 y se evaluó su concentración por medio de una cámara de conteo Thoma. Se calculó la TRE por cada fracción usando la fórmula:

$$\text{TRE} = \frac{\text{conc. post centrifugación} \times \text{vol. post centrifugación}}{\text{conc. pre-centrifugación} \times \text{vol. pre-centrifugación}} \times 100$$

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Para evaluar la motilidad de los espermatozoides se diluyeron las muestras con TCFEY hasta alcanzar una concentración final de 25×10^6 espermatozoides/ml. Se mantuvieron las muestras a una temperatura de 37 °C durante 10 min y posteriormente se colocó una gota (5 µl) de cada muestra en un portaobjetos cubierto con cubreobjetos de 22 × 22 mm. Se tomaron imágenes a una velocidad de 25 fotogramas por segundo de manera aleatoria de cuatro campos, o hasta alcanzar imágenes de un mínimo de 500 espermatozoides. Se consideró un área de la cabeza de los espermatozoides de entre 10 y 70 µm². Los espermatozoides con una velocidad promedio de trayectoria (VAP) >10 µm/seg se clasificaron como móviles, y los que se desviaron <80 % de una línea recta se clasificaron como móviles de manera lineal. En cada muestra de esperma analizada se midieron diez parámetros: motilidad total (TM, %); motilidad progresiva (PM, %), velocidad curvilínea (VCL, µm/seg); velocidad en línea recta (VSL, µm/seg); velocidad de la trayectoria promedio (VAP, µm/seg); rectitud (STR, %); linealidad (LIN, %); oscilación lateral de la cabeza del espermatozoide (WOB, %); amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; µm); y frecuencia de latido/cruzamiento (BCF; Hz). Se utilizó el software ISAS v.1.2 (Proiser, Valencia, España) para la evaluación de la motilidad de los espermatozoides.

Evaluación de la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides

Se utilizó la prueba de hinchazón hipoosmótica (HOST)⁽¹⁶⁾ para medir el estado funcional de la membrana de los espermatozoides. Se diluyeron 10 µl de cada fracción de semen en 100 µl de solución de citrato de sodio hipoosmótico (1.351 g de fructosa, 0.735 g de citrato de sodio y 100 ml de agua bidestilada; 100 mOsmol/kg), y se entibió la solución a la temperatura ambiente durante 30 min. Después de la incubación, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2% y se observaron con microscopía de contraste de fase (aumento 400x). La membrana de los espermatozoides se consideró intacta y funcional cuando la cola de los espermatozoides exhibía enrollamiento. Se analizaron un total de 200 espermatozoides y los resultados se expresaron como un porcentaje de la endosmosis positiva.

Evaluación de la morfología de los espermatozoides

Se usó la tinción de hemacolor (Merck, Darmstadt, Alemania) para identificar las diferentes anomalías morfológicas del espermatozoide⁽¹⁷⁾. Se colocaron 10 µl de semen sobre un portaobjetos y se tiñó siguiendo las indicaciones del fabricante. Se cuantificó el porcentaje de las anomalías basado en el conteo de aproximadamente 200 células espermatozoides (aumento de 1000x) (Olympus, Tokio, Japón).

Evaluación de la viabilidad de los espermatozoides

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó mediante tinción con eosina-nigrosina⁽¹⁸⁾. En resumen, se disolvieron 0.67 g de Eosin Y (Panreac, Barcelona, España) y 0.9 g de cloruro de sodio (Panreac, Barcelona, España) en agua bidestilada (100 ml) bajo un calentamiento suave, y luego se agregaron 10 g de nigrosina (Panreac, Barcelona, España). Se mezcló una gota de 10 µl de muestra de semen con una gota de 10 µl del colorante sobre un portaobjetos de vidrio y se realizó el frotis. Para la evaluación, se analizaron 200 espermatozoides (aumento de 1000x) (Olympus, Tokio, Japón). Los espermatozoides se clasificaron como vivos (es decir, con la membrana intacta) cuando las células no estaban teñidas, o muertas (es decir, con la membrana alterada) cuando se tiñeron de rosa con eosina. Los resultados se expresaron como porcentaje de espermatozoides vivos.

Análisis estadístico

Los datos se muestran en forma de la media \pm DE. Se probó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks, y cuando los datos no eran normales se transformaron. A las variables expresadas como porcentajes (LIN, STR y WOB) se transformaron en arcoseno, mientras que los que están expresados como valores absolutos (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) se transformaron por medio de un logaritmo. Para identificar la TRE y la calidad de los espermatozoides, se aplicó un ANOVA de una vía para comparar los parámetros de los espermatozoides en las diferentes fracciones producidas por SLC, en las dos concentraciones (C800 y C3000), con los valores de espermatozoide fresco. Se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni cuando se detectaron diferencias significativas entre las fracciones ($P \leq 0.05$).

Con el fin de identificar las subpoblaciones de espermatozoides específicas en función a los parámetros cinemáticos, se evaluó un total de 20,485 observaciones de semen fresco y procesado por medio de procedimientos de agregación. Para comenzar, se realizó un análisis de componentes principales (PC) de los datos para reducir las ocho variables estudiadas (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) al menor número de las combinaciones lineales de las variables iniciales (llamados PC) que guardarían la mayor cantidad de la información contenida en las variables originales. Es de esperar que algunos pocos de las PC explican una alta proporción de la varianza total. Se utilizó el

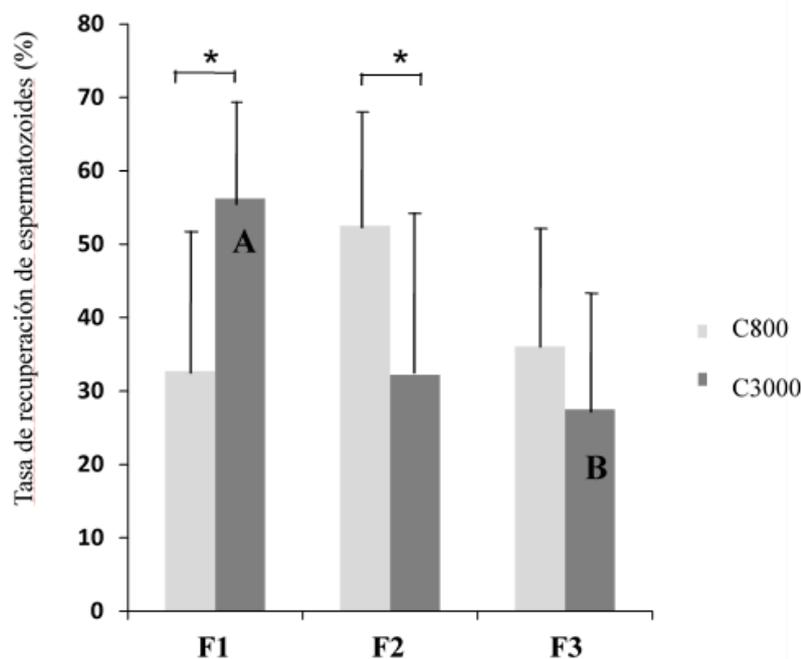
método de rotación varimax y se seleccionó el número de las PC aplicando el criterio de Kaiser para identificar aquellos con un valor propio superior a 1. Se utilizó un procedimiento de agregación de dos pasos para analizar los índices derivados de los espermatozoides producidos por los PC. Se identificaron las diferentes subpoblaciones y se detectaron valores atípicos. Se analizó el tipo de subpoblación de espermatozoides en cada muestra de semen y se utilizó la prueba de Ji-cuadrada para comparar las frecuencias relativas de subpoblaciones dentro de cada muestra (o fracción) de semen. Los análisis estadísticos se hicieron con el paquete SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

Tasa de recuperación por SLC

El porcentaje de recuperación de espermatozoides por SLC en la fracción que, en teoría, contendría los mejores espermatozoides (F3) no difirió ($P>0.05$) entre las concentraciones de C800 (36.1%) y C3000 (27.5%) (Figura 2). En la F1, el porcentaje de recuperación fue mayor en las muestras C3000 que en las C800; lo contrario ocurrió en la F2. En las muestras de C800, no hubo diferencias entre las tres fracciones, mientras en las de C3000 el porcentaje de recuperación en la F1 fue mayor que en la F3.

Figura 2: Tasa de recuperación de espermatozoides (%) en las tres fracciones producidas por SLC en muestras de semen con concentraciones de 800 y 3000 $\times 10^6$ esp/ml; (C800 and C3000)



* Diferencias ($P\leq 0.05$) entre las dos concentraciones dentro de la misma fracción.

^{A, B} Diferencias ($P\leq 0.05$) entre las fracciones dentro de la misma concentración.

Evaluación de los espermatozoides

Los valores de motilidad que corresponden a los espermatozoides aislados en las diferentes fracciones no difirieron entre las fracciones ni entre las concentraciones (C800 a nd C3000) (Cuadro 1).

Cuadro 1: Valores promedios (\pm DE) de la motilidad y de parámetros cinemáticos para las fracciones SLC de espermatozoides en muestras de dos concentraciones

Parámetros	Fracción	C800		C3000	
		FRESCO	SLC	FRESCO	SLC
TM (%)	F1		89.0 \pm 2.0		86.0 \pm 3.5
	F2		88.4 \pm 6.8		86.5 \pm 4.0
	F3		89.5 \pm 2.5		88.5 \pm 6.1
	Completo	87.9 \pm 3.7		89.8 \pm 3.06	
PM (%)	F1		50.3 \pm 7.0		48.2 \pm 4.8
	F2		41.7 \pm 9.6		56.2 \pm 12.2
	F3		37.0 \pm 18.4		48.4 \pm 20.2
	Completo	48.8 \pm 12.2		50.2 \pm 9.0	
VCL (μ m/s)	F1		121.4 \pm 17.6		119 \pm 5.3
	F2		127.3 \pm 12.8		120 \pm 9.7
	F3		133 \pm 18.6		129.9 \pm 12.9
	Completo	117.9 \pm 11.1		124.2 \pm 4.7	
VSL (μ m/s)	F1		72.2 \pm 13.9		69.7 \pm 7.1
	F2		66.5 \pm 12.4		81.8 \pm 11.8
	F3		69.1 \pm 12.3		71.7 \pm 14.6
	Completo	59.9 \pm 18.6		58.2 \pm 18.1	
VAP (μ m/s)	F1		94.9 \pm 16.5		91.5 \pm 7.4
	F2		94.2 \pm 15.4		100.2 \pm 6.9
	F3		96.5 \pm 14.5		95.1 \pm 12.0
	Completo	80.23 \pm 18.0		77.9 \pm 17.5	
LIN (%)	F1		59.4 \pm 6.3		58.4 \pm 3.5
	F2		52.2 \pm 9.0		68.4 \pm 12.3
	F3		52.9 \pm 11.2		56.7 \pm 14.9

	Completo	50.0 ± 10.2	46.6 ± 12.9
STR (%)	F1	76.1 ± 5.5	76.1 ± 2.1
	F2	70.5 ± 5.7	81.3 ± 8.7
	F3	71.4 ± 6.9	74.7 ± 7.8
	Completo	72.8 ± 6.3	73.7 ± 5.8
WOB (%)	F1	77.9 ± 4.6	76.8 ± 3.4
	F2	73.7 ± 8.3	83.8 ± 7.8
	F3	73.5 ± 10.6	74.6 ± 13.3
	Completo	66.7 ± 9.4	62.5 ± 12.3
ALH (µm)	F1	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.4
	F2	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.5
	F3	3.9 ± 0.9	3.9 ± 1.2
	Completo	3.78 ± 0.3	4.3 ± 0.4
BCF (Hz)	F1	8.9 ± 3.2	10.3 ± 0.3
	F2	8.9 ± 2.7	10.0 ± 0.8
	F3	10.1 ± 4.0	10.9 ± 2.0
	Completo	11.9 ± 0.9	12.9 ± 1.6

C800= muestra de 800×10^6 esp/ml; C3000= muestra de 3000×10^6 esp/ml; SLC= centrifugación de una sola capa; F1= fracción superior; F2= fracción media; F3= fracción inferior; TM= motilidad total; PM= motilidad progresiva; VCL= velocidad curvilínea; VSL= velocidad en línea recta; VAP= velocidad de la trayectoria promedio; STR= rectitud; LI=: linealidad; WOB= oscilación lateral de la cabeza del esperma; ALH= amplitud del desplazamiento de la cabeza; BCF= frecuencia latido/cruzamiento.

Los resultados de la viabilidad, la morfología y la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides mostraron que la F3 tuvo los valores más altos (Cuadro 2), aunque no fueron diferentes ($P>0.05$) de los valores de las otras fracciones ni entre las dos concentraciones.

Cuadro 2: Los valores promedios (\pm DE) de la viabilidad, la morfología y la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides en las diferentes fracciones SLC en muestras con dos concentraciones

Parámetros	Fracción	C800		C3000	
		FRESCO	SLC	FRESCO	SLC
Viabilidad (%)	F1		81.2 \pm		91.3 \pm
	F2		92.0 \pm		93.5 \pm
	F3		95.4 \pm		94.8 \pm
	Completo	89.0 \pm 8.9		89.5	
Morfología (%)	F1		61.0 \pm		83.5 \pm
	F2		80.7 \pm		90.3 \pm
	F3		85.3 \pm		93.5 \pm
	Completo	87.6 \pm 5.1		90.1 \pm 3.3	
Funcionalidad de la membrana (%)	F1		64.5 \pm		75.3 \pm
	F2		65.5 \pm		78.7 \pm
	F3		68.3 \pm		80.7 \pm
	Completo	65.4 \pm 1.7		80.6 \pm 4.5	

C800= muestra de 800×10^6 esp/ml; C3000= muestra de 3000×10^6 esp/ml; SLC= centrifugación de una sola capa; F1= fracción superior; F2= fracción media; F3= fracción inferior.

Las subpoblaciones de los espermatozoides

Entre los 20,485 espermatozoides individuales motiles evaluados en este estudio, se identificaron tres subpoblaciones (Cuadro 3).

Cuadro 3: Los valores promedios (\pm DE) de los parámetros cinemáticos y de velocidad usados en la caracterización de las tres subpoblaciones de espermatozoides identificadas en las muestras frescas de semen ovino.

Subpop.	N	%	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
SP1	3,906	19.1	65.5 \pm	18.5 \pm	38.9 \pm	31 \pm	52 \pm	60 \pm	2.9 \pm	5.5 \pm
			41.4	13.4	27.4	2	2	1	1.7	2.5
SP2	8,950	43.7	121 \pm	93.1 \pm	106.9	77 \pm	87 \pm	88 \pm	3.1 \pm	9.4 \pm
			36.2	31.7	\pm 34.4	1	1	8	1.2	2.8
SP3	7,629	37.2	154.4	61.4 \pm	96.7 \pm	40 \pm	65 \pm	63 \pm	5.4 \pm	12.9
			\pm 35.2	26.7	26.9	2	2	1	1.4	\pm 3.1
Total	20,485	100	122.8	67.1 \pm	90.1 \pm	55 \pm	72 \pm	73 \pm	3.9 \pm	10 \pm
			\pm 48.6	38.7	39.6	2	2	2	1.8	3.9

VCL= velocidad curvilínea; VSL= velocidad de línea recta; VAP= velocidad de la trayectoria promedio; STR= rectitud; LIN= linealidad; WOB= oscilación lateral de la cabeza del espermatozoide; ALH= amplitud del desplazamiento de la cabeza; BCF= frecuencia latido/cruzamiento.

En el análisis de PC se identificaron tres componentes que explicaron un 76.70 % de la varianza total (Cuadro 4). Los parámetros de VCL, VSL y VAP se asociaron con el PC1, los de STR y LIN con el PC2 y el WOB con el PC3.

Cuadro 4: El análisis de los componentes principales (PC) con ocho parámetros del esperma, utilizando la rotación varimax

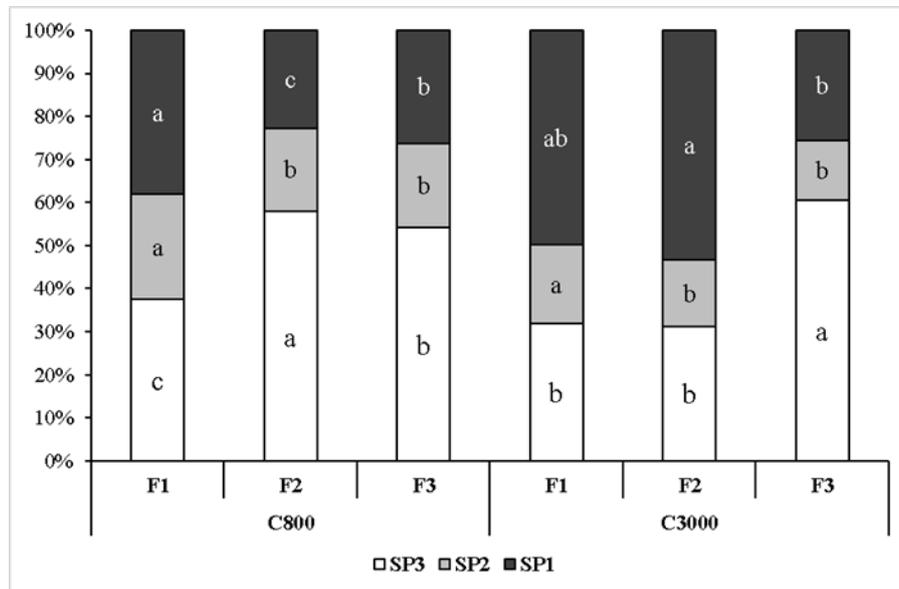
	PC1	PC2	PC3
Valor propio	2.55	2.27	1.31
Porcentaje	31.91	28.35	16.44
Porcentaje acumulativo	31.91	60.26	76.70
VCL	0.96	0.01	- 0.06
VSL	0.70	0.64	0.24
VAP	0.92	0.16	0.29
ALH	0.46	-0.18	- 0.28
BCF	0.23	0.13	- 0.02
LIN	0.11	0.82	0.53
STR	0.06	0.98	0.15
WOB	0.17	0.39	0.89

Pesos ≥ 0.70 están en negritas.

Los espermatozoides incluidos en la subpoblación 1 (SP1) mostraron una velocidad más baja (basada en VCL, VSL y VAP) que los de las otras fracciones y ninguna motilidad progresiva (valores bajos de LIN, STR, WOB, ALH y BCF); un total del 19.1 % de los espermatozoides pertenecían a la SP1. Los que estaban en la SP2 mostraron una velocidad alta (VCL, VSL, VAP y ALH), una progresividad alta (altos valores de LIN, STR y WOB) y buenos valores para el ALH y BCF. Se podría definir esta subpoblación como constituida por espermatozoides rápidos y progresivos; el 43.7 % de los espermatozoides pertenecían a la SP2. Los que estaban en la SP3 mostraron valores altos de VCL, ALH y BCF, pero bajos valores de LIN y STR. Estos espermatozoides se podrían definir como rápidos y no lineales, y representaron el 37.2 % del total.

En las muestras de C800, la SP3 fue más alto ($P \leq 0.05$) en las F2 y F3 que, en la F1, mientras que las SP1 y SP2 fueron más altos ($P \leq 0.05$) en la F1 que en las demás fracciones (Figura 3). El patrón era diferente en las muestras de C3000. La SP2 (rápido y progresiva) fue más alta ($P \leq 0.05$) en la F1 que en las F3 (fracción selectiva) y F2. La alta concentración causó que la mayoría de los espermatozoides en la F3 (la que, en teoría, contiene los mejores espermatozoides) provenían de la SP3 (rápido y no progresivo).

Figura 3: Distribución relativa de las frecuencias de las subpoblaciones de los espermatozoides en las fracciones de semen producidos por SLC en las muestras con concentraciones espermáticas de 800 y 3000×10^6 /ml (C800 and C3000)



^{a b} Distintas letras entre las fracciones de la misma concentración indican diferencia ($P \leq 0.05$).

Discusión

El presente estudio evaluó la capacidad de separación de espermatozoides y las características de las fracciones de semen aisladas después de SLC en muestras normospérmicas de carnero. Con el propósito de confirmar si este procedimiento de separación de espermatozoides podría ser eficaz con eyaculados frescos de carnero, se prepararon las muestras con un volumen de alrededor de 1.5 ml y concentraciones de 800 o 3000×10^6 espermatozoides/ml. Más aún, el enfoque en ocho parámetros cinemáticos permitió la identificación de tres subpoblaciones de espermatozoides diferentes en los eyaculados frescos enteros y en las fracciones separadas por SLC.

Se sabe que la centrifugación del semen puede afectar la motilidad y la integridad de la membrana en los espermatozoides de pequeños rumiantes^(19,20). Sin embargo, el uso de la centrifugación combinada con coloides es una opción prometedora para la selección de los mejores espermatozoides con el propósito de mejorar los resultados de la IA. Con base en los parámetros aplicados en el presente estudio (motilidad, viabilidad, morfología y funcionalidad de la membrana), los resultados sugieren que SLC no produce una separación adecuada de los espermatozoides en el semen normospérmico de carnero. Esto concuerda con un estudio reciente llevado a cabo en ciervo rojo⁽²¹⁾, en el cual se demuestra que el tipo de coloide utilizado afecta la eficiencia de la técnica SLC, y que DLC ofrece una mejor capacidad de separación si las muestras de semen son de baja calidad⁽²²⁾.

De las tres fracciones de espermatozoides aislados por SLC se esperaba encontrar los de mejor calidad en la F3. Sin embargo, los espermatozoides de esta fracción no lograron una mayor motilidad (total y progresiva) que los de las F2 y F1. Los resultados confirmaron que las anomalías morfológicas se reducen mientras los espermatozoides cruzan las capas coloides, pero las diferencias no fueron significativas. Estos resultados están de acuerdo con reportes sobre rumiantes silvestres⁽²³⁾ y llamas⁽²⁴⁾, en donde no se encontraron diferencias morfológicas entre los espermatozoides frescos y los separados en muestras de semen de buena calidad. En otro estudio de esperma de toro, los procedimientos coloidales aumentaron el número de espermatozoides con una morfología normal en muestras de semen de mala calidad⁽²⁵⁾. Sin embargo, cuando se utilizó SLC con muestras normospérmicas no se produjo una ventaja en términos de la separación de espermatozoides con una morfología normal.

Los valores de la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides no variaron después de la aplicación de SLC, no importa la concentración de los espermatozoides (C800 o C3000). Aparentemente, la aplicación de SLC no excluyó de manera eficaz a los espermatozoides con una funcionalidad de membrana, una morfología y/o una viabilidad de bajo nivel. Esto concuerda con los resultados de la separación del semen de equinos por medio de SLC usando Androcoll⁽²⁶⁾. Otros estudios sobre el semen normospérmico de toro no hallaron un efecto de SLC en comparación con muestras no tratadas⁽²⁵⁾.

Según el conocimiento de los autores, este es el primer estudio en analizar las subpoblaciones de espermatozoides de carnero en diferentes fracciones de semen producidas por la SLC. Se confirmó que los eyaculados de carnero contienen subpoblaciones de espermatozoides heterogéneas. Estos determinan la fertilidad, ya que el éxito reproductivo post inseminación ocurre mediante la selección natural de los espermatozoides⁽²⁷⁾. Se puede mejorar la fertilidad que ofrece un eyaculado por medio de procedimientos como la selección de espermatozoides con la centrifugación usando los coloides. Con base en investigaciones previas^(28,29), y después de la evaluación de parámetros cinemáticos individuales en muestras de espermatozoides de carnero en el presente estudio, se pudieron identificar tres subpoblaciones distintas con características diferenciales. Como es de esperar en los eyaculados normospérmicos, la subpoblación que mostraba espermatozoides con motilidad baja y no progresiva (SP1) representaba la proporción más chica en la muestra de semen (19.1 %). Por el contrario, la SP2 (clasificado como rápida y progresiva) representaba el 43.7 %, la subpoblación más grande. Finalmente, la SP3 (rápidos, no lineares) tenía altos valores de VLC y ALH, bajo valores de LIN y STR, y representaba un 37.2 % de los espermatozoides, lo cual está de acuerdo con estudios previos^(28,29).

El procesamiento del esperma de carnero por SLC y el aislamiento de sus diferentes fracciones no es eficaz en la separación de la subpoblación con la mejor motilidad, no importa la concentración de los espermatozoides (C800 o C3000). Por ejemplo, la SP2 no fue la subpoblación más abundante en la F3, como se esperaba. De hecho, muchos de los espermatozoides en la SP2 (considerada como la mejor subpoblación) fueron

retenidos en la segunda interfaz. Una posible explicación para este resultado es que el alto número de espermatozoides incluidos en la muestra podría haber impedido que otros espermatozoides óptimos logren nadar hasta el fondo de los tubos⁽³⁰⁾. En estudios anteriores⁽³¹⁾, se recomienda utilizar SLC para el procesamiento de grandes volúmenes de semen, lo cual sugiere que la alta concentración de espermatozoides (3000×10^6 esp/ml) impidió el funcionamiento adecuado de esta técnica. Los resultados presentes concuerdan con estudios anteriores⁽²³⁾, ya que muestran que las técnicas de selección de semen no mejoran la calidad de los espermatozoides en muestras de semen no estresadas.

Conclusiones e implicaciones

La centrifugación coloidal no es un método eficaz en la selección de espermatozoides en muestras que contienen una alta concentración de espermatozoides de buena calidad (es decir, normospermicas). En futuros estudios sería informativo aplicar la misma técnica con muestras de semen de baja calidad para cuantificar la eficiencia de la separación de semen de carnero por centrifugación coloidal. Además, será importante determinar la capacidad de congelación de las fracciones de espermatozoides separadas por centrifugación coloidal.

Literatura citada:

1. Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Res* 2013;(1-3):128-135.
2. Martínez-Pastor F, Garcia-Macias V, Álvarez M, Herráez P, Anel L, de Paz P. Sperm Subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod* 2005;(2):316-327.
3. Aalberts M, Sostaric E, Wubbolts R, Wauben MW, Nolte-'t Hoen EN. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochim Biophys Acta* 2013;(11):2326-2335.
4. Ou Z, Yanf L, Chen Z, Deng Y, Wang H, Sun L. Comparison of the outcomes of different human spermatozoa selection methods in assisted reproduction. *Biomed Res* 2018;(12):2615-2619.
5. Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R. Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol Reprod* 1986;(4):1059-1063.
6. Valcárcel A, de las Heras MA, Moses DF, Pérez LJ, Baldassarre H. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 1996;(3-4):215-224.

7. Matás C, Vieira L, García-Vázquez FA, Avilés-López K, López-Úbeda R, Carvajal JA et al. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Anim Reprod Sci* 2011;(1-2):62-72.
8. Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reprod Domest Anim* 2009;(3):512-517.
9. Morrell JM, Rodriguez H. Colloid centrifugation of semen: Applications in assisted reproduction. *Am J Analyt Chem* 2016;(7):597-610.
10. Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR, Varner DD. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology* 2012;(5):959-966.
11. Morrell JM. Biomimetics in Action: Practical applications of single layer centrifugation for equine breeding. *J Vet Sci Technol* 2011;(2):107.
12. Goodla L, Morrell JM, Yusnizar Y, Stalhammar H, Johannisson A. Quality of bull spermatozoa after preparation by single-layer centrifugation. *J Dairy Sci* 2014;(4):1-9.
13. Nongbua T, Johannisson A, Edman A, Morrell JM. Effects of single layer centrifugation (SLC) on bull spermatozoa prior to freezing on post-thaw semen characteristics. *Reprod Domest Anim* 2017;(4):596-602.
14. Yulnawati Y, Abraham MC, Laskowski D, Johannisson A, Morrell JM. Changes in bull sperm kinematics after single layer centrifugation. *Reprod Domest Anim* 2014;(6):954-956.
15. Gosalvez J, Johnston S, Lopez-Fernandez C, Gosalbez A, Arroyo F. Sperm fractions obtained following density gradient centrifugation in human ejaculates show differences in sperm DNA longevity. *Asian Pacific J Reprod* 2014;(3):116-120.
16. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;(1):219-228.
17. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Cambridge University Press; 2010.
18. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 2003;(4):813-816.
19. Ritar AJ. Control of ovulation, storage of semen and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. *Aust J Exp Agric* 1993;(6):807-820.

20. Gil J, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 2000;(1):93-108.
21. García-Álvarez O, Soler AJ, Maulen Z, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A et al. Selection of red deer spermatozoa with different cryoresistance using density gradients. *Reprod Domest Anim* 2016;(6):895-900.
22. Maxwell WMC, Parrilla I, Caballero I, Garcia E, Roca J, Martínez EA et al. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm® density gradient centrifugation. *Reprod Domest Anim* 2007;(5):489-494.
23. Santiago-Moreno J, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Rodríguez E, López-Sebastián A. Sperm selection by Capripure® density-gradient centrifugation versus the dextran swim-up procedure in wild mountain ruminants. *Anim Reprod Sci* 2014;(3-4):178-186.
24. Santa Cruz R, Giuliano SM, Gambarotta MC, Morrell JM, Abraham MC, Miragaya MH et al. Comparison of different methods of sperm selection of llama raw semen. *Anim Reprod Sci* 2016;(173):8-12.
25. Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befacchia G, Contri A. Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *J Anim Sci Biotechnol* 2016;(7):1-9.
26. Gamboa S, Quaresma A, Castro F, Bravo P, Rebordão MR, Oom MM *et al.* *In vivo* fertilizing ability of stallion spermatozoa processed by single layer centrifugation with Androcoll-E™. *Saudi J Biol Sci* 2017;(7):1489-1496.
27. Holt WV, Van Look KJW. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 2004;(5):527-535.
28. Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA *et al.* Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim Reprod Sci* 2015;(163):82-88.
29. Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Anim Reprod Sci* 2015;(156):128-134.
30. Bergstein TG, Bicudo LC, Rodello L, Weiss RR, Bicudo SD. Kinematic and spermatic recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016;(6):1539-1547.
31. Morrell JM, Van Wienen M, Wallgren M. Single layer centrifugation can be scaled-up further to process up to 150 ml semen. *ISRN Vet Sci* 2012;1-6.