



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Máster en Producción Animal

Efecto del plasma seminal y el proceso de congelación sobre la calidad espermática en caprino

Effect of seminal plasma and the freezing process on goat bucks sperm quality

Trabajo Fin de Máster

Valencia, Julio 2023

Inés Carolina Esteve Ambrosio

Director/es

José Salvador Vicente Antón

Eva Mocé Cervera

Ernesto A. Gómez Blasco



EFFECT OF SEMINAL PLASMA AND THE FREEZING PROCESS ON GOAT BUCKS SPERM QUALITY

ABSTRACT

In goat bucks the seminal plasma (SP) must be removed before freezing for obtaining surviving the process when egg yolk- or skimmed milk (SM)-based extenders are used. It is clear that SP is prejudicial during the freezing-thawing process in this species but the stage at which SP is lethal for the sperm remains unelucidated. For this reason, the objective of this study was to study the effect of seminal plasma on goat buck sperm quality in each of the stages of the semen freezing process (F: after centrifugation and addition of the first diluent; R: after reaching 4°C; G: after addition of the extender containing glycerol; E: after 90 min of equilibration with glycerol at 4°C; T: after freezing-thawing). Twenty-one ejaculates from seven goat bucks from Murciano-Granadina breed were used in the study. Each of the ejaculates was split into two samples: one of them was processed with SP (SP+) and in the other one the SP was removed (SP-) before freezing. Samples were frozen with a SM-glycerol extender (SM2) and sperm quality (motility and sperm plasma membrane integrity (PMI), acrosomal integrity and mitochondrial functionality) was evaluated at each of the points of the freezing protocol (F, R, G, E and T). The results showed significant differences ($p < 0.05$) in all the quality parameters analyzed, varying among the different stages in terms of significance. The analyses determined that the quality of samples processed without SP was superior to samples processed with SP. The most affected stages were the addition of glycerol and thawing. For the glycerol stage, values in samples with SP+ were 50 % total motile and 34 % live with intact acrosome versus 70 % and 56 %, respectively. In the case of the thawing stage it was more evident, values in samples SP+ were 7 % total motile and 4 % live with intact acrosome versus 40 % and 28 %, to samples SP-. In conclusion, the SP deteriorates the spermatozoa through all the steps of the freezing protocol. However, the stage that affected the most the sperm quality was the freezing-thawing.

Key words: Sperm; Quality; Seminal plasma; Freezing; goat

Student: Inés Carolina Esteve Ambrosio

Supervisors: José Salvador Vicente Antón, Eva Mocé Cervera and Ernesto A. Gómez Blasco

Valencia, July 2023

EFFECTO DEL PLASMA SEMINAL Y EL PROCESO DE CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN CAPRINO

RESUMEN

En los machos cabríos, el plasma seminal (SP) debe eliminarse antes de la congelación para conseguir que sobreviva al proceso cuando se utilizan diluyentes a base de yema de huevo o leche desnatada (SM). Está claro que el SP es perjudicial durante el proceso de congelación-descongelación en esta especie, pero la etapa en la que el SP es letal para los espermatozoides sigue siendo desconocida. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del plasma seminal sobre la calidad espermática del macho cabrío en cada una de las etapas del proceso de congelación del semen (F: tras la centrifugación y adición del primer diluyente; R: tras alcanzar los 4°C; G: tras la adición del diluyente conteniendo glicerol; E: tras 90 min de equilibrio con glicerol a 4°C; T: tras la congelación-descongelación). En el estudio se utilizaron 21 eyaculados de siete machos cabríos de raza Murciano-Granadina. Cada uno de los eyaculados se dividió en dos muestras: una de ellas se procesó con SP (SP+) y en la otra se eliminó el SP (SP-) antes de la congelación. Las muestras se congelaron con un diluyente SM-glicerol (SM2) y se evaluó la calidad espermática (motilidad e integridad de la membrana plasmática espermática (PMI), integridad acrosomal y funcionalidad mitocondrial) en cada uno de los puntos del protocolo de congelación (F, R, G, E y T). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros de calidad analizados, variando entre las distintas etapas en términos de significación. Los análisis determinaron que la calidad de las muestras procesadas sin SP fue superior a las procesadas con SP. Las etapas más afectadas fueron la adición de glicerol y la descongelación. Para la etapa de glicerol, los valores en las muestras con SP+ fueron de 50 % de móviles totales y 34 % de vivos con acrosoma intacto, frente a 70 % y 56 %, respectivamente. En el caso de la etapa de descongelación fue más evidente, los valores en las muestras SP+ fueron 7 % de móviles totales y 4 % de vivos con acrosoma intacto versus 40 % y 28 %, a las muestras SP-. En conclusión, el SP deteriora los espermatozoides a lo largo de todas las etapas del protocolo de congelación. Sin embargo, la etapa que más afectó a la calidad espermática fue la de congelación-descongelación.

Palabras clave: Esperma; Calidad; Plasma seminal; Congelación; caprino

Alumna: Inés Carolina Esteve Ambrosio

Tutores/as: José Salvador Vicente Antón, Eva Mocé Cervera y Ernesto A. Gómez Blasco

Valencia, Julio de 2023

GENERAL INDEX

1.	Introduction.....	1
2.	Objective.....	3
3.	Materials and methods	4
3.1.	Materials and preparation of diluents	4
3.2.	Animals.....	4
3.3.	Semen collection	4
3.4.	Freeze-thaw protocol	5
3.5.	Evaluation of sperm quality	6
3.6.	Statistical analyses.....	8
4.	Results.....	9
5.	Discussion	14
6.	Conclusion.....	21
7.	References	21

INDEX OF FIGURES

Figure 1.	Goat bucks sperm quality (motility variables, n=21) in each stage of freezing protocol when samples were processed in presence (SP+) or in absence (SP-) of seminal plasma (SP).	10
Figure 2.	Goat bucks sperm quality (ALH and BCF, n=21) in each stage of a freezing protocol when samples were processed in presence (SP+) or in absence (SP-) of seminal plasma (SP).	11
Figure 3.	Goat bucks sperm quality (cytometer variables, n=21) in each stage of freezing protocol when samples were processed in presence (SP+) or in absence (SP-) of seminal plasma (SP).	12

INDEX OF TABLES

Table 1.	Effect on sperm quality between the different stages for each treatment, when the samples were processed in presence (SP+) or in absence (SP-) of seminal plasma (SP).....	13
----------	--	----

ABBREVIATIONS

AI: acrosome intact sperm

AI: Artificial insemination

ALH: amplitude of the lateral movement of the head

ALP: alkaline phosphatase

AR: acrosome reacted sperm

AST: aspartate amino transferase

BCF: beat cross frequency

BSA: bovine serum albumin

D30: dilution to concentration of 30×10^6 sperm/mL with TCG

DMM: dead with high mitochondrial membrane potential

DMM: dead with low mitochondrial membrane potential

E: equilibrated

EY: egg yolk

F: Fresh

FITC-PNA: fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin

G: glycerol

H: Hoechst

LDH: lactate dehydrogenase

LIN: linearity

LMB: live with high mitochondrial membrane potential

LMM: live with low mitochondrial membrane potential

M: Mitotracker

MAI: dead acrosome intact sperm

MAR: dead acrosome reacted sperm

MITOK: sperm with a high mitochondria membrane potential

MMP: mitochondria membrane potential

PI: propidium iodide

PM: progressively motile

PMI: Plasma membrane integrity

R: refrigerated

ROS: exogenous oxidative stress

skimmed milk-based (SM)

SM: skimmed milk

SM1: diluent was made with skimmed milk

SM2: was made with SM1 to which 28 % of glycerol (v:v)

SP: seminal plasma

STR: straightness index

T: thawing

TCG: Tris-citrate-glucose

TM: total motile

VAI: live acrosome intact sperm

VAIMITOK: live acrosome intact sperm and high mitochondrial membrane potential

VAP: average path velocity

VAR: live acrosome reacted sperm

VCL: curvilinear velocity

VSL: straight line velocity

WOB: wobble

*Este trabajo va dedicado a mi pequeño y fiel amigo Aslan,
Me enseñaste que la fuerza está dentro de cada uno,
que la palabra rendirse no está en nuestro diccionario
y que nunca se deja de luchar
Estuviste, estás y estarás siempre conmigo.
Te quiero*

ACKNOWLEDGMENTS

Funded by INIA-ERDF (RTA2017-00049-C02-01), GVA-IVIA susceptible of funding by UE through OP ERDF of the Comunitat Valenciana 2021-2027 (52201-K) and AMURVAL (71714).

This project is subjected to the following expressions of interest: AGROALNEXT/2022/063 and AGROALNEXT/2022/062.