

## EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA DOSIS SEMINAL EN LA CRIORRESISTENCIA ESPERMÁTICA DEL MACHO CABRÍO ESTÁ ASOCIADO A LA RELOCALIZACIÓN DE LA AQP3

Alba<sup>1\*</sup>, E., Castaño<sup>1</sup>, C., Velázquez<sup>1</sup>, R., Toledano-Díaz<sup>1</sup>, A., Arrebola<sup>2</sup>, F.A.,  
Fernández-Alaiz<sup>3</sup>, P. y Santiago-Moreno<sup>1</sup>, J.

<sup>1</sup>Dpto. Reproducción Animal, INIA-CSIC, Madrid; <sup>2</sup>Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y Alimentaria (IFAPA) Hinojosa Del Duque, Córdoba;

<sup>3</sup>Arquimea Agrotech, Collado-Villalba, Madrid

\*esther.alba@inia.csic.es

### INTRODUCCIÓN

La concentración óptima de espermatozoides para la congelación de semen de macho cabrío se encuentra entre 100-200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, ya que favorece un mejor rendimiento en la inseminación de esta especie. Sin embargo, el efecto de este factor sobre la criorresistencia espermática no es bien conocido. Dado que la aquagliceroporina 3 (AQP3) podría estar involucrada en los procesos de criotolerancia celular (Yeste *et al.*, 2017), su localización podría proporcionar información clave sobre la capacidad de osmoadaptación de los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la concentración espermática sobre la criorresistencia y la localización de AQP3.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 eyaculados de cuatro machos Murciano-Granadina distribuidos en dos grupos según la concentración espermática: siete a 25 x 10<sup>6</sup> y ocho a 100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Se diluyeron en un diluyente Tris con 6% yema de huevo y 5% glicerol y tras 3 horas de equilibrado a 4°C, se congelaron en vapores de nitrógeno líquido. La motilidad total, progresiva y las variables cinéticas se analizaron mediante el sistema ISAS<sup>®</sup> PRO (ARQUIMEA). La viabilidad espermática se analizó mediante fluorescencia con el sistema de análisis de imagen automatizado SQS2 (ARQUIMEA). La membrana espermática y la integridad del acrosoma se evaluaron mediante fluorescencia usando yoduro de propidio (PI) combinado con aglutinina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA). La identificación y cuantificación de la AQP3 en muestras espermáticas frescas y congeladas-descongeladas se realizó mediante Western Blotting (WB) y la inmunolocalización en distintas regiones del espermatozoide por inmunocitofluorescencia (ICF). Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) para las distintas variables estudiadas (Móviles totales, Móviles Progresivos, Vivos totales, Acrosoma Integro y Vivos con acrosoma íntegro) y análisis de Clúster (Statistica<sup>™</sup>, TIBCO<sup>®</sup>) para los Índices de Criorresistencia (ICR = (valor descongelación/valor refrigerado) x 100) de los eyaculados para una clasificación como buena o mala respuesta a la criopreservación.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los eyaculados congelados a baja concentración aparecían agrupados en el Clúster de baja criorresistencia para todas las variables estudiadas. El WB no mostró diferencias significativas en la cantidad de AQP3 entre las muestras frescas y congeladas. La ICF mostró una mayor ( $p < 0,05$ ) proporción de espermatozoides con AQP3 en el flagelo en los eyaculados congelados a baja concentración. El incremento de AQP3 en la cola de muestras más diluidas podría determinar un flujo excesivo de agua y glicerol que afectase negativamente a la criorresistencia, tal como se ha sugerido en muestras congeladas de caprinos silvestres (Santiago-Moreno *et al.*, 2022). Este hecho contrastaría con los efectos positivos de la relocalización de la AQP3 en la cola del espermatozoide apuntados en moruecos (Pequeño *et al.*, 2023), lo que podría ser explicado por los mayores niveles de dilución y, por tanto, mayor disponibilidad de glicerol en muestras poco concentradas. La relocalización de AQP3 ya había sido descrita en espermatozoides de macho cabrío al comparar diferentes velocidades de enfriamiento durante la congelación (Pequeño *et al.*, 2024).

### CONCLUSIÓN

La congelación a baja concentración espermática compromete su criorresistencia en un proceso en el que parece involucrado una relocalización de AQP3 en la cola del espermatozoide.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Yeste *et al.* 2017. *Reprod Dom Anim.* 52 (Suppl. 4):12-27. • Santiago-Moreno *et al.* 2022. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 2903 • Pequeño *et al.* 2023. *Front. Vet. Sci.* 10: 1167832 • Pequeño *et al.* 2024. *Theriogenology*. 223: 29-35.

**Agradecimientos:** CSIC-Arquimea Agrotech SLU (CID24-220).