

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE VENADO DE CAMPO (*Ozotoceros  
bezoarticus*): COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DOS DILUYENTES  
COMERCIALES A LA DESCONGELACIÓN**

“por”

**Valentina SITYÁ REMEDI**

TESIS DE GRADO presentada como  
uno de los requisitos para obtener el título  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD Ensayo experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

\_\_\_\_\_  
Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
Msc. Florencia Beracochea

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Dra. Solana González-Pensado

Cuarto miembro (Co-tutor)

\_\_\_\_\_  
Dr. Rodolfo Ungerfeld

Fecha:

\_\_\_\_\_  
31-10-2014

Autor:

\_\_\_\_\_  
Valentina Sityá Remedi

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Tutora y amiga Florencia Beracochea por su ayuda en todo momento, por su paciencia infinita y sobre todas las cosas por siempre darme fuerzas para avanzar.

A mi Co-tutor Dr. Rodolfo Ungerfeld por sus correcciones y por su gran aporte frente al proyecto de iniciación a la investigación.

A todos los que participaron en las extracciones en la EFCA: Fernando Fumagalli, Florencia Beracochea, Lorena Lacuesta, Julia Giriboni, Matías Villagrán, Laura Morena, Juan Pablo Damián, Jorge Gil, Rodolfo Ungerfeld, Aline Freitas de Melo, Alejandro Bielli.

Al personal de la ECFA que colaboró con el trabajo de campo: Edgardo Barrios, Ricardo Sorelo y Jhonny Brios.

A la ANII por financiar la beca de iniciación a la investigación.

Un muy especial agradecimiento a mi familia. A mis padres, Benito y Sonia que me dan su apoyo incondicional, su ejemplo y amor. A mis hermanas, Emilia, Camila y a Nacho por estar siempre, para festejar en las buenas y darme fuerzas en las malas.

A mis amigas de siempre y a los que conocí en el pasaje por la Facultad. Por las miles de horas de estudio, charlas y buenos momentos con LA BARRA DEL FONDO: Nacho, María, Ger, Goné, Marquitos, Chiqui, Dani, Vicky, Elisita, Valeria, Muní, Martín y Color 😊

**MUCHAS GRACIAS!!!!**

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Estación reproductiva.....	9
1.2. Conservación y biotecnología.....	10
1.3. Semen.....	11
1.4. Colección seminal.....	12
1.5. Evaluación del material.....	13
1.6. Criopreservación de semen de venado de campo.....	14
1.7. Diluyentes.....	15
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivo.....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Materiales y Métodos.....	20
4.1. Protocolo de criopreservación.....	20
4.2. Protocolo de descongelación.....	20
4.3. Evaluación seminal.....	21
4.4. Análisis estadístico.....	23
5. Resultados.....	24
5.1. Calidad de la motilidad y motilidad espermática.....	24
5.2. Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosomica.....	24
6. Discusión.....	27
7. Conclusión.....	29
8. Bibliografía.....	30

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Macho adulto de venado de campo ( <i>Ozotoceros bezoarticus</i> ).....	9
Figura 2. Muestra seminal de venado de campo ( <i>Ozotoceros bezoarticus</i> ) colectada durante la estación reproductiva mediante electroeyaculación.....	15
Figura 3. Esquema de los diferentes momentos de evaluación de las muestras seminales de venado de campo.....	21
Figura 4. Representación de los cambios morfológicos producidos en los espermatozoides bajo condiciones hipoosmóticas.....	22
Figura 5. Calidad de la motilidad (A), porcentaje de espermatozoides móviles (B) y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva, diluidos con Andromed o Triladyl en función del momento de evaluación.....	25
Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (A) y porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (B) de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva en función del momento de evaluación.....	26

## RESUMEN

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*), es un cérvido autóctono, que se encuentra en peligro de extinción. Para intentar disminuir la tasa de desaparición de ésta y otras especies, es posible desarrollar programas destinados a la preservación de material genético, por ejemplo criopreservando espermatozoides. Para la correcta criopreservación seminal se deben adicionar compuestos químicos (diluyentes) que permitan la viabilidad y fertilidad del semen. El objetivo de este experimento fue comparar dos diluyentes comerciales para la criopreservación de semen de venado de campo. Para ello se utilizaron muestras colectadas durante la estación reproductiva, las que fueron diluidas con dos diluyentes, Andromed (sin yema de huevo) o Triladyl (20% yema de huevo), a partir de 10 machos adultos de la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar. Las muestras fueron evaluadas al momento de la colección e inmediatamente luego de la descongelación, a la hora y a las 2 h posdescongelación, determinando la calidad de la motilidad (escala 0-5), el porcentaje de espermatozoides mótils y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. También se fijaron muestras para la determinación del porcentaje de espermatozoides con anomalías, así como para la evaluación de la integridad acrosómica y de membrana de los espermatozoides. Las muestras diluidas con Triladyl tendieron a presentar mejores resultados en comparación con Andromed en cuanto a la calidad de la motilidad ( $p=0,1$ ), el porcentaje de espermatozoides mótils ( $p=0,07$ ), el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ( $p=0,07$ ) y criopreservaron mejor la integridad de membrana de los espermatozoides ( $p=0,001$ ). La calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides mótils y el porcentaje de espermatozoides mótils progresivos disminuyeron al transcurrir el momento de evaluación ( $p<0,0001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre diluyentes en el porcentaje de anomalías espermáticas, ni en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros. Existieron diferencias significativas al transcurrir el momento de evaluación en el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas ( $p<0,0001$ ) y en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro ( $p=0,003$ ). Se concluyó que el diluyente Triladyl fue más efectivo que Andromed para criopreservar las muestras seminales de venado de campo.

## SUMMARY

Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) is a native deer that is currently endangered of extinction. Trying to reduce the rate of disappearance of this and other species, it is possible to develop programs for genetic material preservation such as sperm cryopreservation. To obtain good results in sperm cryopreservation, it is necessary to add chemicals (extenders) to improve sperm viability and fertility. The aim of this experiment was to compare two commercial extenders for cryopreservation of pampas deer sperm. The samples were collected during the breeding season and were diluted with two extenders: Andromed (without egg yolk) or Triladyl (20% egg yolk) from 10 adult male of "Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar". Samples were evaluated after the collection, immediately after the thawed, 1h and 2h postthawed, determining motility score (scale 0-5), the percentage of motile sperm and the percentage of progressively motile sperm. Also the incidence of sperm morphologic abnormalities and the percentage of sperm with acrosomal integrity and sperm membrane. Samples diluted with Triladyl tended to have better quality of motility ( $p=0.1$ ), percentage of motile sperm ( $p=0.07$ ), percentage of sperm with progressive motility ( $p=0.07$ ) and preserve better the membrane integrity ( $p=0.001$ ) than those preserved with Andromed. The quality of motility, the percentage of sperm motile and the percentage of sperm with progressive motility decreased over the time ( $p<0.0001$ ). No differences were noticed within extender in the percentage of sperm abnormalities and in the acrosome integrity of the sperm. However significant difference were found during the evaluation time in the percentage of sperm abnormalities ( $p<0.0001$ ) and in the acrosome integrity of sperm ( $p=0.003$ ). To conclude, Triladyl was more effective than Andromed for pampas deer sperm cryopreservation.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cérvidos son un grupo diverso de ungulados que se caracterizan por su gran variedad en lo que respecta a su morfología, fisiología, ecología y distribución geográfica (Asher, 2010). El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*; Linnaeus, 1758) es un cérvido autóctono, que habitaba todo el territorio nacional (Jackson *et al.*, 1980). La disminución de la cantidad y tamaño de sus poblaciones determinó que la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) lo incluya en el Libro Rojo de las Especies en Peligro de Extinción, en la categoría casi amenazado (NT) (UICN, 2014). Además, está incluido en el Apéndice I de CITES (Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de flora y fauna silvestre), considerada como una de las especies con mayor peligro de extinción (CITES, 2013). A nivel nacional, el venado de campo es reconocido como especie prioritaria para la conservación (González *et al.*, 2013). Sus principales amenazas son la caza, la pérdida y fragmentación de hábitat, la competencia con el ganado doméstico, y enfermedades como la fiebre aftosa (González *et al.*, 2010).

El venado de campo, es un cérvido de color bayo sin manchas (Figura 1), que originalmente habitaba la mayor parte de las praderas de Sudamérica (Jackson & Langguth, 1987), observándose en grandes grupos en el campo en los siglos XVII y XVIII (Thornback & Jenkins, 1982). Los machos presentan mayor tamaño que las hembras, con un largo promedio de 130 cm y 75 cm de altura, y el peso máximo al que llegan es 35 kg. Presentan astas que son renovadas anualmente (González *et al.*, 2001; González *et al.*, 2010). En invierno se produce la caída de las mismas, periodo en el que la concentración de testosterona está en su nadir (González-Pensado, 2011).

En Uruguay, el venado de campo presenta dos poblaciones actualmente disyuntas, con diferencias genéticas y morfológicas que han dado lugar a la descripción de dos subespecies (González *et al.*, 2002). Estas poblaciones son endémicas, viven en estado silvestre, una en el departamento de Rocha (*O.b. uruguayensis*; 33° 45' S, 54° 02' O) y la otra en Salto (*O.b. arerunguaensis*; 31° 65' S, 56° 43' O) (Weber & González, 2003). La población en semicautiverio más grande de la especie a nivel mundial, con aproximadamente 70 animales, se encuentra en la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA), Uruguay, (34° 48' S, 55° 14' O), originada a partir de animales capturados en la población de Salto (Ungerfeld *et al.*, 2011).

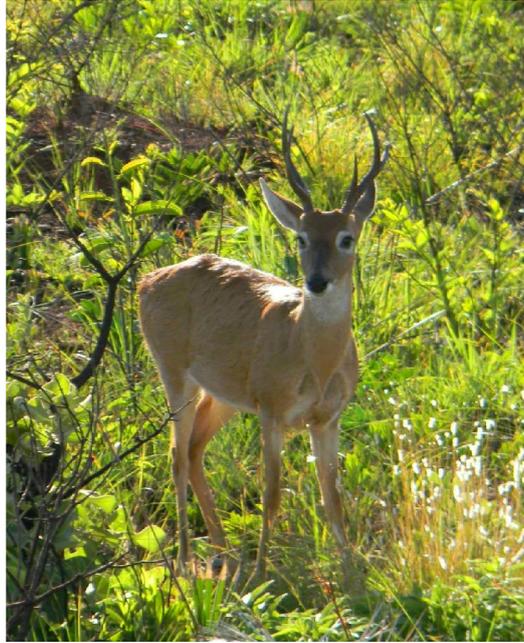


Figura 1. Macho adulto de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*).

### **1.1. Estación reproductiva en machos**

En la mayoría de las especies de cérvidos, especialmente las que habitan zonas templadas, se observan patrones estacionales de reproducción, lo que es determinado fundamentalmente por el fotoperiodo (Lincoln, 1985). Los machos de estas especies, por ejemplo el ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*) presenta alternancia de períodos de fertilidad e infertilidad relacionados con cambios en el tamaño de los testículos y la función reproductiva (Asher *et al.*, 1987; Gosch *et al.*, 1989). Se constató que justo antes del período reproductivo los machos gamo (*Dama dama*) presentan un tamaño testicular máximo, siendo mínimos cuando las astas comienzan a crecer de nuevo (Gosch *et al.*, 1989). Las especies tropicales de cérvidos generalmente están menos sujetas a la estacionalidad (*Axis axis*: Loudon & Curlewis, 1988). Sin embargo, los machos exhiben patrones cíclicos anuales en el crecimiento de las astas (*Axis axis*: Loudon & Curlewis, 1988). Esto se refleja además, en cambios estacionales en las características seminales con un aumento del volumen eyaculado, del número total de espermatozoides por eyaculado, así como un aumento en el porcentaje de espermatozoides móviles (Asher *et al.*, 1996).

La estación reproductiva del venado de campo en la ECFA ocurre durante los meses de enero-abril (verano-otoño), siendo definida como el período en que los machos presentan interacciones agonistas, muestran comportamiento agresivo y las peleas son visualizadas con mayor frecuencia

(González-Pensado, 2011; Ungerfeld *et al.*, 2008). Las concentraciones séricas de testosterona varían estacionalmente, siendo mayores en otoño, y menores durante el invierno y primavera. A su vez, las características seminales presentan la mayor calidad de la motilidad durante el verano-otoño, y la menor en la primavera; siguiendo el patrón estacional de las concentraciones de testosterona (González-Pensado, 2011). A pesar de ello, en la ECFA se han registrado nacimientos durante todo el año, por lo que se puede inferir que los venados de campo pueden reproducirse durante todo el año (Ungerfeld *et al.*, 2008). En la población de la ECFA, el patrón estacional de los venados es aparentemente menos estricto en comparación con las poblaciones silvestres. Una posible explicación es que en la población de la ECFA el suministro de alimentos es homogéneo a lo largo del año y en las poblaciones silvestres no. Esto sugiere que la disponibilidad de alimentos tiene una influencia directa en la actividad cíclica reproductiva (Ungerfeld *et al.*, 2008).

## **1.2. Conservación y biotecnología**

La UICN (UICN, 2014) reportó que existe un gran porcentaje de mamíferos en serio peligro de extinción, principalmente por pérdida o fragmentación de hábitat. Por esta razón, es de suma relevancia perfeccionar técnicas de conservación tanto *in situ* como *ex situ*. La conservación *in situ* se realiza en el mismo hábitat, mediante la restauración o mediante la repoblación. La conservación *ex situ* se realiza mediante técnicas artificiales, como son los zoológicos o utilizando biotecnologías reproductivas (Holt & Pickard, 1999). Para intentar disminuir la tasa de desaparición de ésta y otras especies, es posible desarrollar programas destinados a la preservación de material genético, concretamente criopreservando los ovocitos, embriones y espermatozoides (Holt & Pickard, 1999) para su posterior utilización en técnicas de biotecnología reproductiva.

La criopreservación de semen es utilizada como una técnica de conservación en varias especies en peligro de extinción (Wildt, 1992). El perfeccionamiento de técnicas de criopreservación de material genético permite obtener una reserva de variabilidad genética y aumentar la probabilidad de sobrevivencia de la especie en el futuro. En particular, la criopreservación de semen permite preservar el material genético de cada individuo durante decenas de años, posibilitando su uso futuro, o su uso en lugares distantes (Holt & Pickard, 1999). La utilización de semen certificado libre de enfermedades constituye una forma segura en cuanto a la prevención de diferentes patologías. Otra de las ventajas, es la posibilidad de utilizar machos incapacitados para la copula debido a lesiones o por razones de edad (Evans & Maxwell, 1990). Es importante resaltar la facilidad que implica el intercambio de

material genético sin la necesidad de transportar a los animales (Evans & Maxwell, 1990), lo que reduce los costos y el espacio necesario, minimizando los riesgos y evitando el estrés de los animales.

### **1.3. Semen**

El semen está formado por dos constituyentes principales: el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal es una mezcla de líquidos secretados por glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes y otras glándulas accesorias (Evans & Maxwell, 1990). Tiene tres funciones principales:

- Actúa como vehículo para el transporte de los espermatozoides desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación.
- Sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles.
- Proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse en el aparato reproductor de la hembra (Evans & Maxwell, 1990).

Los espermatozoides son los gametos masculinos producidos en los túbulos seminíferos de los testículos. Cada uno de ellos es una célula altamente especializada formada por dos partes principales: cabeza y cola (Evans & Maxwell, 1990). La cabeza es plana y ovoide, ocupada casi en su totalidad por el núcleo; la parte anterior está envuelta por una caperuza especial llamada acrosoma, portadora de las enzimas necesarias para el proceso de fertilización. La cola es semejante a un flagelo; es el órgano locomotor de los espermatozoides. Estas dos partes están conectadas mediante un cuello corto, conocido como la región de implantación (pieza media) (Evans & Maxwell, 1990).

Los espermatozoides pueden presentar diferentes tipos de movimientos:

- Movimiento progresivo hacia adelante
- Movimiento circular o rotatorio
- Movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición.

La energía necesaria para mantener la viabilidad y motilidad de los espermatozoides procede de azúcares –especialmente la fructosa– presentes en el plasma seminal (Evans & Maxwell, 1990). Se debe tener en cuenta que hay muchos factores que pueden afectar la supervivencia de los espermatozoides, como por ejemplo, cambios bruscos en la temperatura, luz

solar directa, el contacto con metales o con el agua (reduce la presión osmótica), impurezas (bacterias, polvo, orina, etc.), desinfectantes y antisépticos (Evans & Maxwell, 1990).

#### **1.4. Colección seminal**

Existen distintas técnicas para la colección de semen y ésta será elegida en función de la especie. En algunos animales se puede montar un maniquí con una vagina artificial, llamada “trampa espermática” para facilitar la colección de semen (Duarte & García, 1995). También es posible colectar semen del epidídimo de animales recientemente muertos (Zomborszky *et al.*, 1999) o mediante electroeyaculación (Duarte & García, 1995). La técnica de electroeyaculación para la colección de semen se ha utilizado en varias especies de ciervos (Asher *et al.*, 2000); por ejemplo Martínez-Pastor *et al.* (2008) la utilizó ciervo rojo, Umapathy *et al.* (2007) con el ciervo axis (*Axis axis*), y Asher *et al.* (1988) con el ciervo del padre David (*Elaphus davidianus*). Actualmente este método es utilizado en el venado de campo en la ECFA (Fumagalli *et al.*, 2012). Para realizar la electroeyaculación se debe utilizar un electroeyaculador, el que consta de un vástago equipado con electrodos y una fuente de energía. Dicho proceso permite la electroestimulación mediante una sonda rectal que emite impulsos eléctricos de corta duración y de intensidad creciente, intercalando con breves períodos de descanso. La mayoría de las colecciones de semen en ciervos se han realizado mediante electroeyaculación con el animal anestesiado o sedado. A la fecha se ha realizado este procedimiento exitosamente en una gran variedad de ciervos, existiendo una gran variabilidad entre machos en cuanto a la estimulación requerida para producir una eyaculación satisfactoria. Al utilizar la electroeyaculación en el venado de campo bajo anestesia general, éste incrementa la frecuencia cardiaca y aumentan las enzimas marcadoras de daño muscular (Creatina quinasa y Aspartato aminotransferasa; Fumagalli *et al.*, 2012). Sin embargo, con omisión del estrés y de las contracciones musculares ocurridas durante el proceso de electroeyaculación no deberían existir efectos secundarios permanentes (Evans & Maxwell, 1990).

La colecta mediante electroeyaculación se produce generalmente en fracciones, que pueden ser recogidas por separado, y generalmente una de las fracciones (fracción espermática) tiene una concentración mucho más alta de espermatozoides que las demás (Gizejewski *et al.*, 2003). Martínez-Pastor *et al.* (2009) proponen como una buena estrategia para evitar la posible contaminación de la muestra con orina, cambiar el tubo de colección entre fracciones. Desde un punto de vista práctico, recoger la fracción espermática del eyaculado para la criopreservación sería la mejor opción, descartando tubos contaminados con

orina y con secreciones de las glándulas sexuales anexas (bulbouretrales, glándula vesicular, próstata) (Martínez-Pastor *et al.*, 2009).

### **1.5. Evaluación de semen**

La evaluación de la muestra de semen consiste en la asignación subjetiva de un valor de la calidad de la motilidad espermática, medida del pH, percepción del aspecto (coloración y consistencia) y determinación del volumen eyaculado. También se debe determinar la concentración de espermatozoides en el eyaculado, el porcentaje de espermatozoides móviles y de espermatozoides con motilidad progresiva, presencia e incidencia de diferentes anomalías espermáticas, así como la integridad de membrana de los espermatozoides.

La calidad de la motilidad espermática es un parámetro que se puede evaluar subjetivamente, asignándole un valor del 0 al 5 (Soler *et al.*, 2003):

- 0- No existe motilidad
- 1- Existe un movimiento débil de la cola, no se observa un movimiento progresivo
- 2- Movimiento progresivo moderado, generalmente con un patrón en círculo
- 3- Movimiento progresivo moderado
- 4- Movimiento progresivo rápido
- 5- Movimiento progresivo muy rápido

La calidad de la motilidad y la motilidad individual se deben observar mediante microscopía óptica con contraste de fase, bajo un cubre-objeto, observando varios campos, determinando la proporción de espermatozoides móviles y la calidad de la motilidad de los mismos (Evans & Maxwell, 1990).

El cálculo del volumen y de la concentración de espermatozoides del eyaculado debe hacerse de forma precisa, ya que de estos dos parámetros va a depender el número de dosis seminales que pueden elaborarse a partir de un eyaculado (Howard & Pace, 1998). El volumen eyaculado se determina mediante pesada, con balanza de precisión o también se puede realizar aspirando con una micropipeta graduada (Goeritz *et al.*, 2003). Para la concentración espermática, el método más preciso para la evaluación del eyaculado es el recuento de espermatozoides en un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) (Boixo, 1996; Goeritz *et al.*, 2003).

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar un ovocito debe reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho

parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal (Holt & Van Look, 2004). El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte en el tracto genital de la hembra y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles o ausencia de motilidad será descartado para su criopreservación (Holt & Van Look, 2004).

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes. Además deben ser capaces de alcanzar el oviducto, llevar a cabo la fecundación del ovocito y contribuir al desarrollo embrionario (Muiño, 2008). Por esta razón, la evaluación del material debe incluir la mayor cantidad de características espermáticas como sea posible.

### **1.6. Criopreservación de semen en venado de campo**

La colecta seminal de animales no mansos se debe realizar mediante electroeyaculación. La criopreservación de semen en una especie como el venado de campo es un proceso laborioso, que implica un manejo muy delicado de los animales. Los machos deben ser anestesiados y trasladados a una sala donde se pueda monitorear en forma continua sus parámetros vitales para realizar la colección seminal (Fumagalli *et al.*, 2012). Se debe tener en cuenta que el volumen de semen colectado, así como su concentración son muy escasos (Villagrán *et al.*, 2010; Beracochea, 2014), obteniendo pocas pajuelas de cada animal para criopreservar (Figura 2). A esto se suma que el procedimiento no puede repetirse en forma frecuente por el propio manejo del animal, además de que la calidad seminal global colectada en estación no reproductiva no permite una adecuada criopreservación de los espermatozoides, disminuyendo la cantidad de pajuelas que se pueden criopreservar por año (Beracochea, 2012; 2014).



Figura 2. Muestra seminal de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) colectada durante la estación reproductiva mediante electroeyaculación.

Para una correcta criopreservación de los espermatozoides deben adicionarse compuestos químicos que criopreserven la viabilidad y fertilidad del semen (Yoshida *et al.*, 2000), ya que el éxito de tecnologías como la inseminación artificial dependen de una calidad de la motilidad adecuada del semen que se va a utilizar.

### **1.7. Diluyentes utilizados para la criopreservación**

La familia Cervidae pertenece al orden Artiodactyla, así como los bovinos, ovinos y caprinos. Esta proximidad facilita la utilización de técnicas empleadas en estas especies, con pequeñas modificaciones (Duarte & García, 1995). Para una correcta criopreservación del semen, es necesario la adición de un diluyente que permita la supervivencia de los espermatozoides a largo plazo (Yoshida *et al.*, 2000). La selección del diluyente a utilizar y el protocolo de congelación son pasos fundamentales para la consolidación de programas de reproducción artificiales de cualquier especie (Martínez-Pastor *et al.*, 2009).

Los diluyentes que se adicionan deben presentar buena capacidad amortiguadora a los cambios de pH. También es importante que el diluyente tenga una fuente de energía como glucosa o fructosa y para evitar el crecimiento microbiano se debe adicionar también antibióticos (Evans & Maxwell, 1990). Además, deben tener sustancias crioprotectoras para proteger a los espermatozoides del daño criogénico, siendo el glicerol el más utilizado y efectivo tanto en experiencias con cérvidos, como en otros rumiantes. Se ha

comprobado que el glicerol criopreserva las características físicas del citoplasma así como la permeabilidad de la membrana evitando la formación de cristales de hielo (Hammerstedt & Graham, 1992). La concentración adecuada de glicerol se encuentra en un rango de 4% a 6% en el carnero según Fiser & Fairfull (1986); concentraciones de glicerol mayores a 8% resultan tóxicas y contribuyen en gran medida a la disminución progresiva de la supervivencia espermática (Fiser & Fairfull, 1986).

La yema de huevo protege a la célula espermática del choque de frío durante la criopreservación debido a su composición en lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Watson, 2000) y de fosfolípidos que actúan recubriendo la membrana celular (Quinn *et al.*, 1980). Se han observado buenos resultados en la criopreservación de semen de distintas especies de ciervos con el uso de diluyentes de diferentes composiciones, pero utilizando yema de huevo como crioprotector [ciervo rojo: Martínez-Pastor *et al.*, 2006; ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*): Jacobson *et al.*, 1989]. Sin embargo, con el ciervo del Padre David (*Elaphurus davidianus*) se obtuvieron modestos porcentajes de motilidad luego de utilizar diluyentes similares (Asher *et al.*, 1988). Martínez-Pastor *et al.* (2009) colectaron semen de ciervo rojo mediante electroeyaculación con el fin de evaluar la efectividad de dos diluyentes comerciales: Andromed (sin yema de huevo) y Triladyl (20% yema de huevo). Si bien, ambos fueron recomendados para su utilización; Triladyl produjo mayor viabilidad posdescongelación y Andromed presentó mayor poder de criopreservación de acrosomas.

El diluyente Triladyl ha sido utilizado anteriormente en rumiantes silvestres para la criopreservación de semen de gacela (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhor* y *G. dorcas neglecta*; Garde *et al.*, 2003), ciervo axis (Haigh *et al.*, 1993) y ciervo rojo (Zomborszky *et al.*, 2005) con resultados positivos. El diluyente Andromed no requiere para su preparación yema de huevo (Martínez-Pastor *et al.*, 2009), lo que constituye una ventaja al disminuir las posibilidades de transmisión de enfermedades. La ausencia de compuestos de origen animal disminuye el riesgo de contaminación microbiológica (Carballo, 2005), y previene variaciones en partidas de pajuelas o efectos indeseados de microorganismos (Carballo, 2005). Andromed mostró resultados similares a los obtenidos utilizando diluyentes con yema de huevo cuando se comparó la viabilidad espermática de los espermatozoides bovinos (Aires *et al.*, 2003). Andromed presenta además la ventaja de ser altamente transparente lo que aumenta la eficiencia a la evaluación microscópica, mostrando imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio. Ello además, facilita la detección y el descarte de eyaculados de calidad cuestionable (Carballo, 2005).

Frente a estos resultados se considera de gran relevancia comparar muestras seminales diluidas con Andromed o Triladyl colectadas en el venado de campo, ya que la posibilidad de utilizar un diluyente libre de compuestos de

origen animal sería muy beneficioso para evitar riesgos de contaminación por diferentes factores (microbiológicos, hormonales, etc.).

## **2. HIPÓTESIS**

El diluyente Andromed criopreserva las muestras seminales de venado de campo colectadas durante la estación reproductiva de forma similar al diluyente Triladyl.

### **3. OBJETIVO**

#### ***3.1. Objetivo general***

Comparar la efectividad de dos diluyentes comerciales (Andromed y Triladyl) a la descongelación de semen de venado de campo, colectadas durante la estación reproductiva mediante electroeyaculación.

#### ***3.2. Objetivos específicos***

- Comparar la efectividad de dos diluyentes comerciales (Andromed y Triladyl) a la descongelación de semen de venado de campo a lo largo del tiempo.
- Determinar la calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides motiles y porcentaje de espermatozoides motiles progresivos.
- Determinar el porcentaje de anormalidades espermáticas.
- Determinar el porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros.
- Determinar el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana luego de la descongelación de semen.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***4.1. Colección y criopreservación seminal***

Las muestras fueron colectadas y criopreservadas durante la estación reproductiva (febrero 2010 - abril 2012) a partir de 10 machos adultos de la ECFA. Los venados utilizados tuvieron un peso promedio de 35kg y edades entre 3 y 7 años. Los animales fueron capturados mediante la administración de anestésicos lanzados con cerbatana. Se utilizó 1,6 mg/ kg ketamina 5% (Vetanarcol; Laboratorio Konig), 2,0 mg/ kg de xylazina 10% (Sedomin; Laboratorio Konig, Buenos Aires, Argentina) y 0,013 mg/ kg de atropina 1% (Sulfato de Atropina; Laboratorio ION, Montevideo, Uruguay). Luego se los trasladó a la sala veterinaria para monitorear los parámetros vitales (frecuencia cardiaca y respiratoria) y colectar el semen mediante electroeyaculación. El semen colectado fue caracterizado mediante un espermograma básico. Luego, se dividió el volumen seminal en dos alícuotas diluyendo una parte en Andromed y otra en Triladyl; estas muestras fueron incluidas en pajuelas. Para la curva de enfriado se colocaron las pajuelas en un freezer dentro de un recipiente con 4 lts de agua a temperatura ambiente; cuando la temperatura llegó a 5°C se dejó equilibrando en heladera durante dos horas. Luego, las pajuelas fueron colocadas a vapores de nitrógeno líquido (-80°C) durante 10 min para posteriormente criopreservarlas en el tanque de nitrógeno.

### ***4.2. Protocolo de descongelación***

A partir de las muestras diluidas con Andromed o Triladyl criopreservadas en la ECFA, se procedió a realizar la comparación de las muestras diluidas con ambos diluyentes en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Para la descongelación de las muestras seminales, se extrajeron las pajuelas del tanque de nitrógeno líquido (-196°C) a una conservadora con nitrógeno líquido. Luego se la mantuvo durante 10 s a temperatura ambiente sujetándola con una pinza por uno de los extremos, para posteriormente introducirla en un baño maría con suero fisiológico (37°C) durante 30 s (Renard & Babinet, 1984). Luego de secar cuidadosamente la pajuela, fue cortada en ambos extremos, depositando la muestra en un tubo eppendorf previamente atemperado en baño (37°C) cortando el otro extremo (correspondiente al algodón).

### 4.3. Evaluación seminal

El semen fue evaluado luego de su colección, determinando el espermiograma básico ( $T_0$ : calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva) y se fijaron muestras para su posterior evaluación de las morfologías espermáticas y de la integridad acrosómica de los espermatozoides. Para evaluar la efectividad de los diluyentes a lo largo del tiempo posdescongelado de cada pajuela se realizó un espermiograma a distintos tiempos posdescongelado como se observa en la figura 3 ( $T_1$ : momento de la descongelación;  $T_2$ : 1 h posdescongelación;  $T_3$ : 2 h posdescongelación). Para todas las evaluaciones se utilizó un microscopio óptico 400X con contraste de fases (Nikon, modelo Eclipse E200, Japón), con platina atemperada a 37°C. Dicho espermiograma incluyó la asignación de un valor de calidad de la motilidad (escala 0-5), y la determinación del porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Soler *et al.*, 2003).

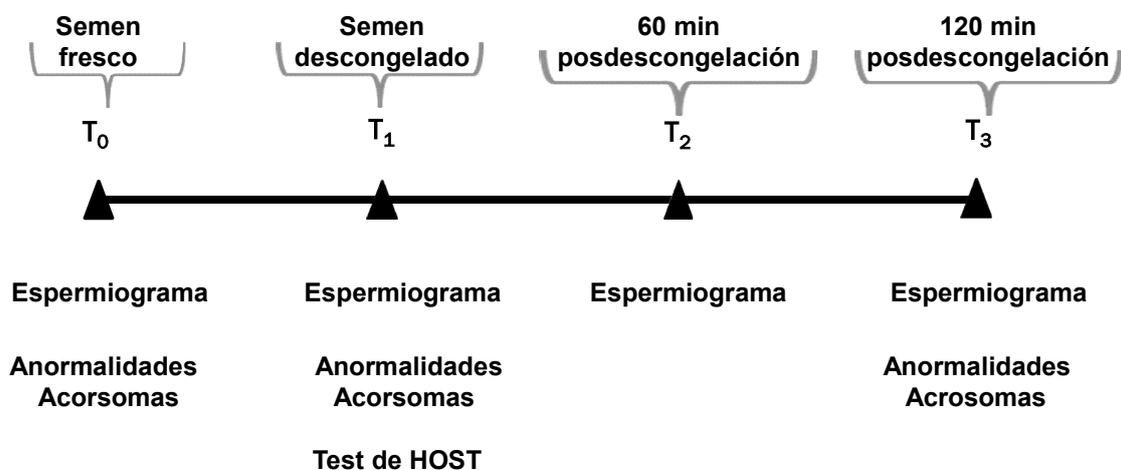


Figura 3. Esquema de los diferentes momentos de evaluación de las muestras seminales de venado de campo.

De cada pajuela se fijó una muestra en formol-citrato en  $T_1$  y  $T_3$  posdescongelación para analizar posteriormente el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (primarias y secundarias) y la integridad acrosómica con microscopio óptico con contraste de fase (Pursel & Johnson, 1974). Para determinar el porcentaje de espermatozoides con anomalías se contabilizaron 100 espermatozoides, al igual que para determinar la integridad acrosómica de los espermatozoides. Además, luego de la descongelación ( $T_1$ ) se realizó la técnica de HOST (Jeyendran *et al.*, 1984), incubando la muestra seminal en una solución hipoosmótica (100 mOsm) durante 15 minutos y posteriormente se fijó en formol-citrato. La respuesta de los espermatozoides reactivos (vivos) a la solución hipoosmótica es la hinchazón, debido a que son capaces de mantener el equilibrio osmótico favoreciendo la entrada de agua ya que sus membranas funcionan correctamente (HOST +). Los espermatozoides HOST + muestran cambios principalmente de enrollamiento de cola y pieza media como se visualiza en la Figura 4 (Jeyendran *et al.*, 1984).

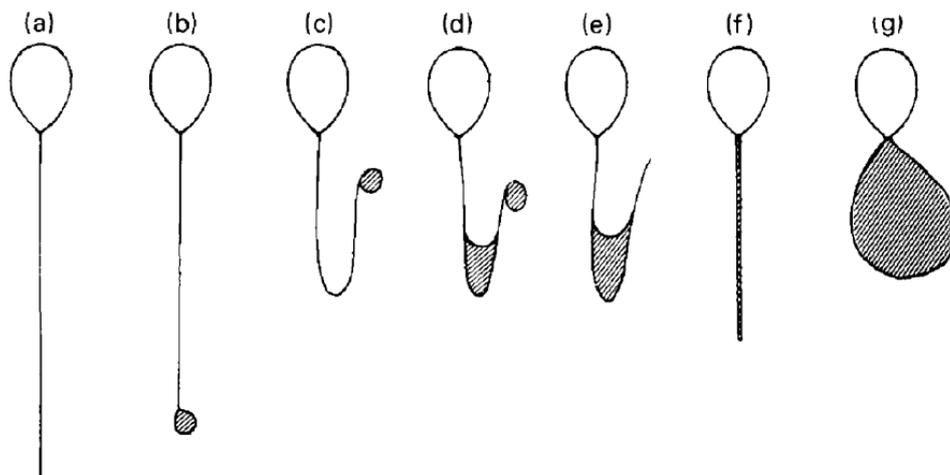


Figura 4. Representación de los cambios morfológicos producidos en los espermatozoides bajo condiciones hipoosmóticas: a) no presenta cambios; b-g) cambios morfológicos de la cola (Jeyendran *et al.*, 1984).

#### **4.4. Análisis estadístico**

Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas, determinando el efecto de los diluyentes (Andromed o Triladyl) y la influencia en los diferentes tiempos de evaluación ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ). El porcentaje de espermatozoides vivos se comparó mediante el Test de t de Student.

Los datos se presentan como media  $\pm$  EE. Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## **5. RESULTADOS**

### ***5.1. Calidad de la motilidad y motilidad espermática***

El diluyente Triladyl tendió a criopreservar mejor la calidad de la motilidad ( $p=0,1$ ; Figura 5A), el porcentaje de espermatozoides móviles ( $p=0,07$ ; Figura 5B) y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ( $p=0,07$ ; Figura 5C) que Andromed. No hubo interacción entre el tratamiento y el momento en que se realizaron las evaluaciones en las tres variables mencionadas, pero todos los parámetros disminuyeron a lo largo del proceso de evaluación ( $p<0,0001$ ; Figura 5).

### ***5.2. Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosomica***

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales, ni en la integridad del acrosoma de los espermatozoides entre los diluyentes. Tampoco hubo una interacción entre el tratamiento y el momento en que se realizó cada evaluación en estas variables. Para ambas variables existieron diferencias significativas a lo largo del proceso ( $p<0,0001$ ;  $p=0,003$ , respectivamente; Figura 6).

Las muestras diluidas con Triladyl preservaron mejor la integridad de membrana de los espermatozoides que las diluidas con Andromed ( $71,3\pm 3,8$  vs  $64,1\pm 4,6$ ;  $p=0,001$ ).

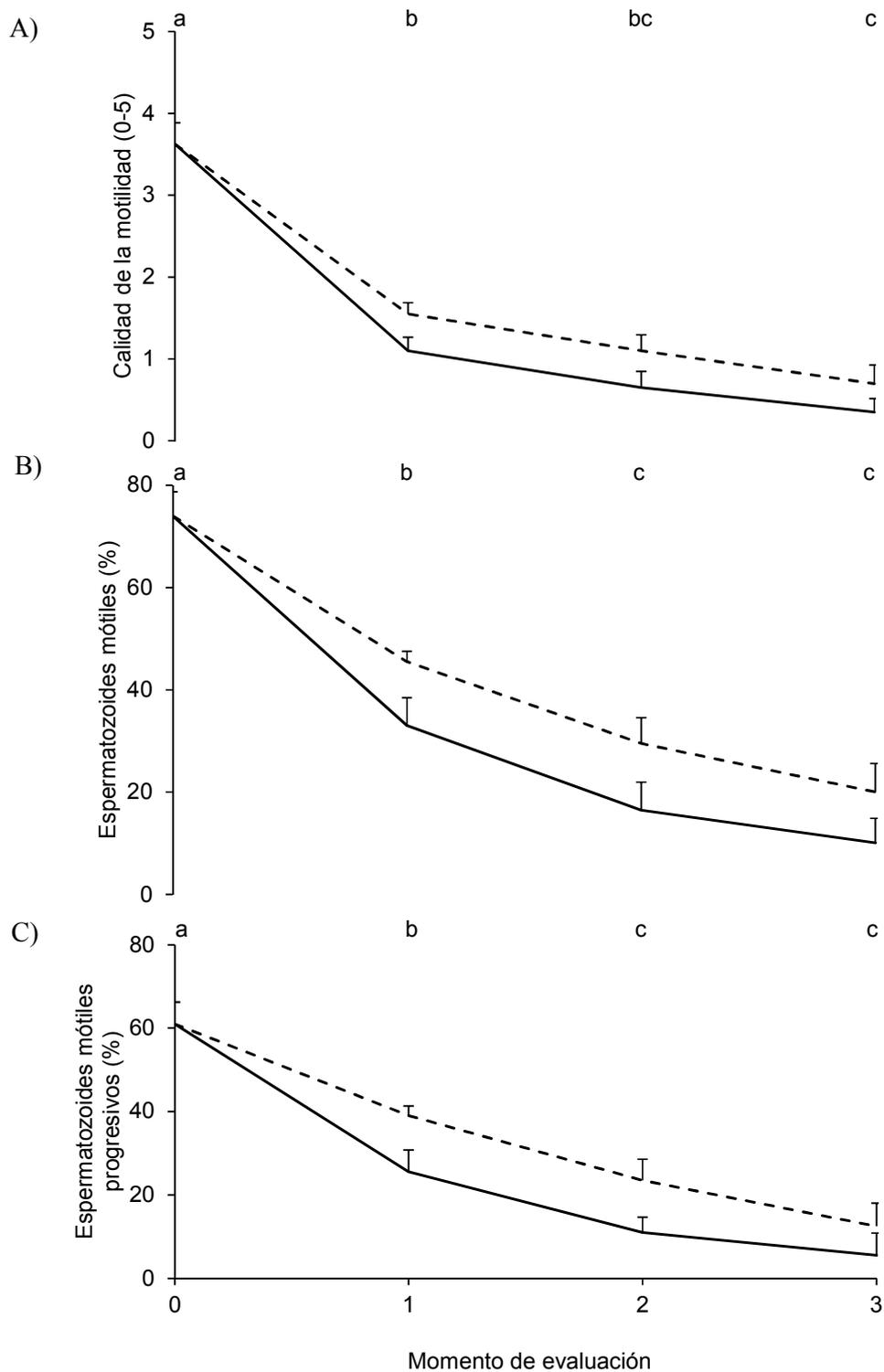


Figura 5. Calidad de la motilidad (A), porcentaje de espermatozoides móviles (B) y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (C) de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva, diluidos con Andromed (—) o Triladyl (- - -) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1: posdescongelación; 2: 1 h posdescongelación; 3: 2 h posdescongelación).

Diferentes letras:  $p < 0,05$ .

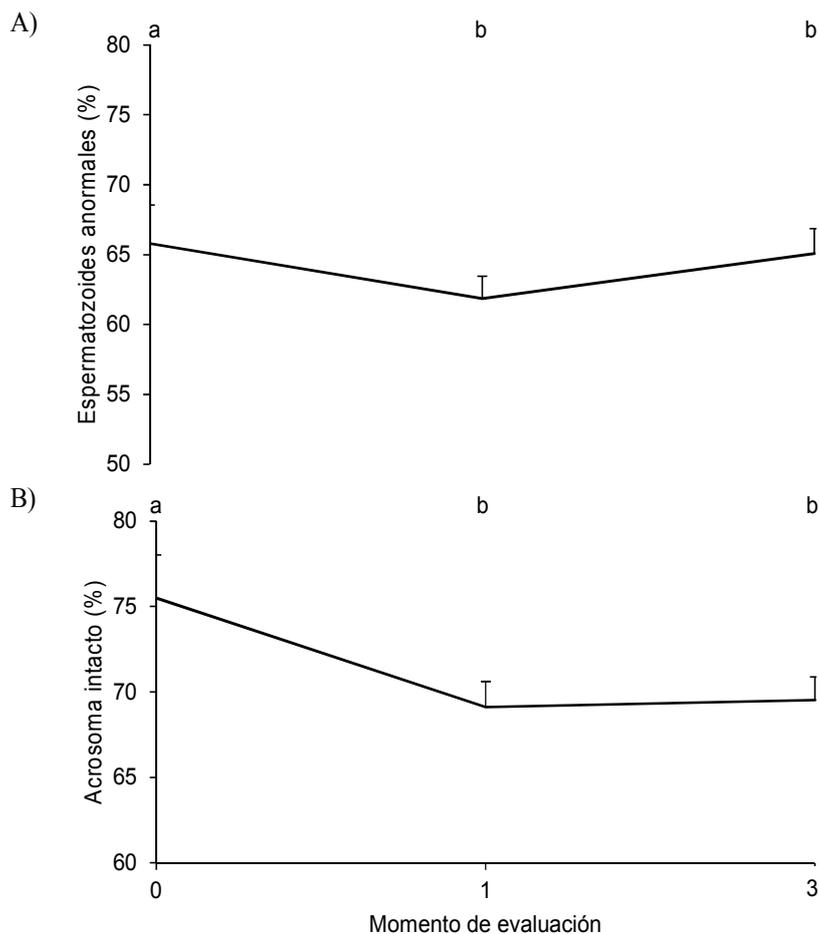


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (A) y porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro (B) de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva. Las muestras diluidas con Andromed y Triladyl fueron agrupadas por no presentar diferencias entre los tratamientos y se presentan en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1; posdescongelación; 3: 2 h posdescongelación). Diferentes letras:  $p < 0,05$ .

## **6. DISCUSIÓN**

Triladyl resultó más efectivo para preservar el semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva que Andromed. En las condiciones en que se realizó éste trabajo, el diluyente Triladyl tendió a criopreservar mejor que Andromed la motilidad espermática y la integridad de membrana de los espermatozoides, lo que podría deberse a la adición de la yema de huevo. En el ciervo rojo (Martínez-Pastor *et al.*, 2006) y en el ciervo cola blanca (Jacobson *et al.*, 1989) se ha demostrado que la criopreservación de semen utilizando un diluyente con yema de huevo fue efectivo en proteger la membrana espermática y la motilidad de los espermatozoides. Sin embargo, dado que la composición de los diluyentes no sólo difiere en la adición o no de la yema de huevo, sino que también difieren en el porcentaje de otros componentes, así como en algunos compuestos no especificados por el fabricante, esto podría estar limitando la interpretación de los resultados.

Se encontró un alto porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros en las muestras diluidas con ambos diluyentes, lo que es fundamental para que ocurra la reacción acrosómica (Gilbert, 2005). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Martínez-Pastor *et al.* (2009), quienes testearon estos mismos diluyentes obteniendo características de viabilidad espermática y porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros muy similares entre sí.

Hay que tener en cuenta que se observó una disminución de la motilidad espermática a lo largo del tiempo de incubación de los espermatozoides diluidos con ambos diluyentes, lo que podría ser un indicador de una baja fertilidad de esos espermatozoides. A la hora de evaluación, la calidad de la motilidad adquiere valores cercanos a cero. Por esta razón, se debería testear la fertilidad de los espermatozoides descongelados en estudios de fertilización *in vitro* o mediante técnicas de inseminación artificial para comprobar su eficacia. La calidad de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles de muestras diluidas con ambos diluyentes fueron menores a los resultados obtenidos previamente al diluir muestras seminales de venado de campo con otros diluyentes (Beracochea, 2012). Si bien se debe tener en cuenta la alta variabilidad de los parámetros iniciales del semen fresco (Beracochea, 2014); esta observación podría implicar que estos diluyentes presentan menor capacidad de criopreservación que otros diluyentes utilizados para criopreservar semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva (Beracochea, 2012). Sin embargo, en función de los datos obtenidos en esta tesis, si hubiera que optar por uno de los diluyentes

analizados para criopreservar el semen de venado de campo, el Triladyl sería el más adecuado.

## **7. CONCLUSIÓN**

El diluyente Triladyl fue más efectivo en la descongelación de muestras de semen de venado de campo colectadas durante la estación reproductiva que el diluyente Andromed.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

1. Aires, V.A., Hirsch, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699> - [AFF1](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699) K., Mueller-Schloesser, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699> - [AFF2](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699) F., Bogner, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699> - [AFF1](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699) K., Mueller-Schloesser, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699> - [AFF2](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699) S., Hinscha E., (2003) *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60: 269-279.
2. Asher, G.W., (2007) Gestation length in red deer: genetically determined or environmentally controlled? En: Juengel, J.L., Murray, J.F., Smith, M.F., *Reproduction in Domestic Ruminants VI*. Nottingham, Nottingham University Press, pp. 255-260.
3. Asher, G.W., (2010) Reproductive cycles of deer. *Animal Reproduction Science* 124: 170-175.
4. Asher, G.W., Adam, J.L., James, R.W., Barnes, D., (1988) Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronised oestrus. *Animal Production* 47: 487-492.
5. Asher, G.W., Berg, D.K., Evans, G., (2000) Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science* 62: 195-211.
6. Asher, G.W., Berg, D.K., Beaumont, S., Morrow, C.J., O'Neill, K.T., Fisher, M.W., (1996) Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian X European fallow deer (*D. d. mesopotamica* X *D. d. dama*). *Animal Reproduction Science* 45: 201-215.
7. Asher, G.W., Day, A.M., Barrell, G.K., (1987) Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *Journal of Reproduction and Fertility* 79: 353-362.
8. Beracochea, F., (2012) Comparación de diluyentes para preservación de semen de venado de campo. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. 33 pp.
9. Beracochea, F., (2014) Caracterización y criopreservación de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Tesis de Maestría en Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. 124 pp.
10. Boixo, J.C., (1996) Valoración laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. *Información Veterinaria*. 165: 33-37.

11. Carballo, D.M., (2005) Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Tesis de grado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Veracruz. 42 pp.
12. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, (2013) Appendices I, II y III. Disponible en: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>. Fecha de consulta: 20/03/2014.
13. Duarte, J.M., García, J.M., (1995) Reprodução assistida em Cervidae Brasileiros. Revista Brasileira de Reprodução Animal 19(1-2): 111-121.
14. Evans, G., Maxwell, W.M.C., (1990). Inseminación en ovinos. En: Evans, G., Maxwell, W.M.C., Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Acribia, pp. 25-34.
15. Fiser, P.S., Fairfull, R.W., (1986) Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolarity of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. Theriogenology 25(3): 473-484.
16. Fumagalli, F., Villagarán, M., Damián, J.P., Ungerfeld, R., (2012) Physiological and biochemical parameters in response to electroejaculation in adult and yearling anesthetized pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. Reproduction in Domestic Animals 47: 308-312.
17. Gilbert, S.F., (2005) Fecundación: el comienzo de un nuevo organismo. En: Gilbert, S.F., Biología del desarrollo. 7a Ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 882: 197-201.
18. Gizejewski, Z., Snochowski, M., Mayntz, M., (2003) Fractions of the semen of red deer (*Cervus elaphus*) - their occurrence and characteristics in different periods of season. Journal of Veterinary Science 6(3): 219-223.
19. Goeritz, F., Quest, M., Wagener, A., Fessbender, M., Broich, A., Hildebrandt, T.B., Hofmann, R.R., Blottner, S., (2003) Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. Theriogenology 59: 1487-1502.
20. González, E. M., (2001) Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción al estudio de los mamíferos. Montevideo, Ed. Vida Silvestre, 206 p.
21. González, E. M., Martínez, J.A., (2010) Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Montevideo, Banda Oriental, 464 p.
22. González, E. M., Martínez- Lanfranco, J.A., Soutullo, A., Juri, E., Rodales, A.L., Botto, G., (2013) Mamíferos. En: Soutullo, A., Clavijo, C., Martínez- Lanfranco, J.A. (eds.) Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Montevideo, SNAP/DINAMA/MVOTMA, 224 p.

23. González, S., Alvarez-Valin, F., Maldonado, E.J., (2002) Morphometric differentiation of endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with the description of new subspecies from Uruguay. *Journal of Mammalogy* 83(4): 1127-1140.
24. González- Pensado, S.X., (2011) Estacionalidad reproductiva en machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos y juveniles. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Biología. Montevideo, Uruguay. 81 pp.
25. Gosch, B., Bartolomaeus, T., Fischer, K., (1989) Light and scanning electron microscopy of fallow deer (*Dama dama*) spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 87: 187-192.
26. Garde, J.J., Soler, A.J., Cassinello, J., Crespo, C., Malo, A.F., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.M.S., (2003) Cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction* 69: 602-611.
27. Haight, J.C., Dradjat, A.S., English, A.W., (1993) Comparison of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 24: 454-458.
28. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., (1992) Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29: 26-38.
29. Holt, W.V., Pickard, A.R., (1999) Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction* 4: 143-150.
30. Holt, W.V., Van Look, J.W., (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* 127: 527-535.
31. Howard, T.H., Pace, M.M., (1998) Seminal evaluation and artificial insemination. En: Laing, J.A., Morgan, W.J., Wagner, W.C., Tindall B. *Fertility and Infertility in Veterinary Practice*. London, Amazon, pp. 39-51.
32. Jackson, J.E., Landa, P., Langguth, A., (1980) Pampas deer in Uruguay. *Oryx* 15: 267-272.
33. Jackson, J.E., Langguth, A., (1987). Ecology and status of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Argentinean pampas and Uruguay. En: Wemmer, C. (ed.). *Biology and management of the Cervidae*, Washington, Smithsonian Institution Press, pp. 402-409.
34. Jacobson, H.A., Bearden, H.J., Whitehouse, D.B., (1989) Artificial insemination trials with white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management* 53: 224-227.
35. Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M. B., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-228.
36. Lincoln, G.A., (1985). Seasonal breeding in deer. En: Brown, R.D. (eds.). *Biology of Deer*. New York, Springer- Verlag, pp. 165-180.

37. Loudon, A.S., Curlewis, J.D., (1988) Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *Journal of Reproduction and Fertility* 83(2): 729-38.
38. Martínez, A.F., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., de Paz, P., Garde, J.J., Anel, L., (2008) Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* 70: 216-226.
39. Martínez- Pastor, F., Martínez, F., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Soler, A.J., Grade, J.J., de Pazm P., Anel, L., (2009) Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 71: 628-638.
40. Martínez- Pastor, F., Martínez, F., García-Macías, V., Esteso, M.C., Anel, E., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., de Paz, P., Garde, J., Anel, L., (2006) A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 66: 1165-1172.
41. Muiño, R., (2008) Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, Santiago de Compostela. 104 pp.
42. Pursel, V.G., Johnson, L.A., (1974) Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 2: 63-68.
43. Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G., (1980) Evidence that phospholipids protect spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility* 60: 403-407.
44. Renard, J.P., Babinet, C., (1984) High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straw with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *Journal of Experimental Zoology* 230: 443-448.
45. Saacke, R.G., (1970) Morphology of the sperm and its relationship to fertility. *Proceedings of Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*. Columbia, USA MO: National Association for Animal Breeders. pp. 17-30.
46. Serrano, G.L., Fuentes, A., de Sosa, G., Valle, A., Regueiro, C., (1996) Estudio de las anomalías espermáticas del verraco en relación con raza, tipo y época. *Zootecnia Tropical* 14(1): 17-34.
47. Soler, A.J., García, A.J., Fernández-Santos, M.R., Esteso, M., Garde, J.J., (2003) Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Journal of Andrology* 24(5): 746-756.
48. Thornback, J., Jenkins, M., (1982) *The IUCN mammal red data book*. Part II. Gland, UICN, 513 p.
49. UICN, 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species*. *Ozotoceros bezoarticus* ssp. *uruguayensis* disponible en:

- [<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/15803/0>]. Fecha de consulta 20/03/2014.
50. Umapathy, G., Sontakke, S.D., Reddy, A., Shivaji, S., (2007) Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology* 67: 1371-1378.
  51. Ungerfeld, R., González- Pensado, S., Villagarán, M., Bielli, A., Rossini, C., Morales, J., Pérez, W., Damián, J.P., (2011) Biología reproductiva del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Montevideo, UCUR, 107 p.
  52. Ungerfeld, R., González-Sierra, T., Piaggio, J., (2008) Reproduction in a semi-captive herd of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. *Wildlife Biology* 14: 350-357.
  53. Villagrán, M., Beracochea, F., Sestelo, A., González, S., Ungerfeld, R., (2010) Female effect on pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): Semen differences between males in permanent contact or isolated from females. 7TH International Deer Biology Congress. Huilo Huilo, Chile, 59 p.
  54. Watson, P.F., (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60/61: 481-92.
  55. Weber, M., González, S., (2003) Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. *Ecoscience*, IO 443-454.
  56. Wildt, D., Monfort, S.L., Donoghue, A.M., Johnstone, L.A., Howard, J., (1992) Embryogenesis in conservation biology- or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 37: 161-184.
  57. Yoshida, M., Forsberg, M., Greve, T., Gustafsson, H., Katila, T., Kindahl, H., (2000) Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproductive Science* 60/61: 349-355.
  58. Zomborszky, Z., Nagy, S., Nánássy, L., Szabari, M., Bodó, S., (2005) Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions- a pilot study. *Animal Reproduction Science* 90(1-2): 185-190.
  59. Zomborszky, Z., Zubor, T., Tóth, J., Horn, P., (1999) Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Veterinaria Hungarica* 47(2): 263-270.