



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



Estacionalidad y criopreservación de semen en chivos de Gabón

María Noel Viera Fittipaldi

TESIS DE MAESTRÍA

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Ungerfeld
Co-Director de Tesis: Dr. Julián Santiago-Moreno
PEDECIBA – BIOLOGÍA
Opción Ciencias Fisiológicas
Universidad de la República

Noviembre, 2018
Montevideo, Uruguay

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS

Alejo Menchaca, PhD

Instituto de Reproducción Animal Uruguay

Montevideo, Uruguay

(Presidente)

Alejandro Bielli, PhD

Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la
República

Montevideo, Uruguay

Joanna Gonçalves de Souza, PhD

Universidade Federal Fluminense

Niterói, Río de Janeiro, Brasil

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de Tesis Rodolfo Ungerfeld por su orientación en el trabajo experimental y en la escritura del mismo.

A mi co-tutor de Tesis Julián Santiago-Moreno, por sus aportes y su buena disposición.

Al tribunal de esta Tesis: Alejo Menchaca, Alejandro Bielli y Joanna Gonçalvez de Souza.

A la Facultad de Ciencias por formarme como profesional y a la Facultad de Veterinaria por ser mi segunda casa.

Al equipo de INIA (Madrid, España) por abrirme sus puertas y por hacerme sentir en casa durante mi estancia.

A Rosario Velázquez especialmente, mi compañera de RIA, gracias por tu buena disposición, por los datos interesantes de la ciudad de Madrid durante mi estancia, pero sobre todo gracias por las risas y las enseñanzas.

A Emma O'Brien por ser mi compañera de mate.

A Berenice Bernal por acompañarme en las salidas por la ciudad de Madrid.

A Cristina Castaño, por el buen humor de todas las mañanas.

A Adolfo Toledano por sus enseñanzas y por su ayuda siempre que la necesite.

A Paula Bóveda, gracias por tu amistad y compañía.

A *Jose y Toño* mis amigos mexicanos, gracias por hacer mi estancia en Madrid una de las mejores experiencias de mi vida, pero sobre todo, muchas gracias por ser mis amigos.

A mis compañeros del Departamento de Fisiología, Florencia Beracochea, Matías Villagrán, Julia Giriboni, Lorena Lacuesta y Patricia Silveira, por sus aportes y sus charlas del día a día.

En especial a mis compañeros del "*fondo*" Florencia Beracochea y Matías Villagrán, por sus consejos, su ayuda y porque hacen que el trabajo se vuelva divertido. Gracias por estar siempre presentes y ser una guía para mí en este camino de la investigación.

A Milton Pintos, por el cuidado de los animales y por estar siempre que se lo necesite, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A Patricia Silveira, Victoria Urioste, Carlos Machado, Felipe Aristegui, Antonela Geymonat, Nicolás Canteras, María Jesús Frisch, Lucía Fazzio, Victor Mayorca y Augusto Ryonosuke por ser parte de este trabajo y por hacer que cada muestreo se llenara de risas.

A mi familia, pero por sobre todo a mi madre, que me da su apoyo incondicional y que ha sabido comprender mis ausencias. Gracias por todas las herramientas que me has dado para transitar este camino.

A *Mathi* que supo acompañarme en todo este trayecto, que supo entenderme y que siempre me dio el apoyo para seguir mis sueños.

A Vane Lujambio por su ayuda con la escritura.

A mis amigos de siempre, que están ahí pase lo que pase.

A *Kimba*, mi compañera de todos los días.

A PEDECIBA Biología por permitirme realizar este posgrado y seguir formándome como profesional.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar este proyecto y al Proyecto del Plan Estatal del MINECO (España) AGL2014-52081-R quien financio parte de la investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Integración de tribunal de Tesis.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de contenido.....	1
Lista de figuras.....	3
Resumen.....	4
Summary.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Regulación neuroendocrina de la reproducción en machos.....	8
1.2. Estacionalidad reproductiva.....	9
1.3. Influencia de la testosterona sobre los parámetros seminales.....	10
1.4. Plasma seminal.....	11
1.5. Criopreservación espermática.....	12
1.5.1. Factores que afectan el resultado de la criopreservación espermática.....	13
1.5.2. Vitrificación de semen (“congelación ultrarrápida”).....	14
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Animales y su manejo.....	17
4.2. Colección seminal.....	17
4.3. Evaluación de semen fresco y purificado.....	17
4.4. Adición de diluyente, congelación clásica, descongelación y purificación.....	18
4.5. Adición de diluyente, congelación ultrarrápida, descongelación y purificación.....	18
4.6. Colección de sangre y medición sérica de testosterona.....	19
4.7. Análisis de datos.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Cambios estacionales en la concentración de testosterona y las características de semen fresco.....	21
5.1.1. Parámetros seminales de semen fresco.....	21
5.2. Efectos de las etapas de los procesos de criopreservación.....	24
5.2.1. Porcentaje de espermatozoides móviles.....	24
5.2.2. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.....	27
5.2.3. Calidad de la motilidad.....	29
5.2.4. Porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.....	31
5.2.5. Porcentaje de espermatozoides vivos.....	31
5.2.6. Porcentaje de espermatozoides normales.....	34
5.2.7. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro.....	34
5.2.8. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado.....	37

5.2.9. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido.....	37
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIONES.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patrón anual de partos y de celos fértiles calculados en la población de cabras de Gabón del Parque Lecocq, Montevideo, Uruguay.....	10
Figura 2. Dispositivo de descongelación ultrarrápida (DDP70).....	19
Figura 3. Concentración de testosterona de muestras de suero sanguíneo de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	21
Figura 4. Parámetros de semen fresco de chivos de Gabón a lo largo de los meses de colección. A) Volumen de semen eyaculado (mL), B) motilidad espermática en masa (0-5) y C) calidad de la motilidad (0 -5).....	22
Figura 5. Porcentaje de espermatozoides móviles almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU).....	25
Figura 6. Porcentaje de espermatozoides móviles almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón a lo largo de los meses de colección.....	26
Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva almacenados mediante la técnica congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU).....	27
Figura 8. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	28
Figura 9. Calidad de la motilidad de espermatozoides almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU).....	29
Figura 10. Calidad de la motilidad de semen almacenado mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	30
Figura 11. Porcentaje de espermatozoides con membrana funcional almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	32
Figura 12. Porcentaje de espermatozoides vivos almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	33
Figura 13. Porcentaje de espermatozoides normales almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	35
Figura 14. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	36
Figura 15. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	38
Figura 16. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido almacenados mediante la técnica de congelación ultrarrápida y de congelación clásica de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección.....	39

RESUMEN

La baja fertilidad obtenida en pequeños rumiantes con el uso de semen criopreservado ha llevado a la búsqueda de metodologías alternativas de preservación de semen, como la congelación ultrarrápida de espermatozoides. Recientemente se desarrolló una nueva técnica de congelación ultrarrápida, anteriormente llamada vitrificación cinética, para la preservación de semen ovino y caprino en el Departamento de Reproducción Animal de INIA (Madrid, España). Este trabajo forma parte de una línea desarrollada en colaboración entre dicha institución y el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria (UdelaR). El objetivo del presente trabajo fue comparar la efectividad de la congelación ultrarrápida y la congelación clásica para conservar semen de chivos en diferentes momentos del año. Durante un año se colectó semen de 10 chivos adultos de la raza de Gabón en forma quincenal mediante electroeyaculación. En las muestras frescas se procedió al análisis de diferentes parámetros seminales, incluyendo volumen, concentración, motilidad espermática en masa, calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva, con membrana funcional, porcentaje de espermatozoides vivos, normales y con acrosoma íntegro, dañado y perdido. Luego se procedió a la purificación del semen fresco mediante centrifugación de gradientes de densidad (BoviDilute™ y BoviPure™), y en esta etapa se analizó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva y espermatozoides normales de cada una de las muestras procesadas. Una vez purificadas las muestras seminales, se dividió cada una de ellas en dos alícuotas. A una de las alícuotas se le añadió el diluyente de congelación clásica (TCG + 6% yema de huevo + 5% glicerol), se mantuvo a 5 °C durante 3 h y se congeló, en pajuelas, mediante vapores de nitrógeno líquido; antes de proceder a su congelación se analizaron los mismos parámetros que en el semen fresco a excepción de volumen, concentración y motilidad espermática en masa. A la alícuota restante de cada muestra se le realizó el mismo procedimiento antes mencionado, con la salvedad de que se le agregó diluyente de congelación ultrarrápida (TCG + 6% yema de huevo + 100 mM sucrosa), se mantuvo a 5 °C durante 30 min y se congeló en pellets mediante disposición de gotas de semen diluido directamente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C) en pajuelas (congelación convencional) o en pellets dentro de criotubos (congelación ultrarrápida). A los 4 meses se procedió a su descongelación, y se analizaron los mismos parámetros que en el semen diluido, pero en esta etapa se utilizó el sistema ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático) para la evaluación de la motilidad. Luego, el semen fue pasado a través de una columna de purificación, evaluando los mismos parámetros antes mencionados. Además, se colectaron muestras de sangre de forma semanal, para determinar las concentraciones séricas de testosterona. Los datos quincenales se agruparon como medias mensuales para todos los parámetros analizados con modelos mixtos. Se analizó la concentración de testosterona sérica a lo largo de los meses de colección, obteniéndose diferencias significativas ($P < 0,0001$) y presentándose valores máximos durante los meses de abril y mayo. En relación a los parámetros seminales, el volumen de semen varió a lo largo de los meses de colección ($P = 0,002$), alcanzando su valor máximo en el mes de julio. Se observaron diferencias significativas en la motilidad espermática en masa a lo largo de los meses de colección, disminuyendo sus valores desde octubre a noviembre, para luego mantenerse ($P < 0,0001$). La calidad de la motilidad varió a lo largo de los meses de colección ($P = 0,008$), observándose un aumento significativo de febrero a

marzo. La concentración espermática y los porcentajes de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva, con membrana funcional, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides normales, y de espermatozoides con acrosoma íntegro, dañado y perdido no variaron a lo largo del tiempo. Se presentaron diferencias significativas entre las técnicas a favor de la congelación clásica cuando se incluyó en el modelo el semen fresco, purificado y una vez añadido el correspondiente diluyente de congelación clásica/ultrarrápida (semen previo a la criopreservación) en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro ($P < 0,0001$). Cuando se consideró la etapa de descongelación ultrarrápida/clásica, utilizándose como factores principales las técnicas, el tiempo, y sus interacciones, el semen preservado mediante congelación clásica tuvo mejor calidad de la motilidad ($P = 0,006$), porcentaje de espermatozoides móviles ($P < 0,0001$), con motilidad progresiva ($P < 0,0001$), con su membrana funcional ($P = 0,0007$) y acrosoma íntegro ($P = 0,03$). Cuando se analizó el semen descongelado luego de ser purificado, se obtuvieron diferencias significativas a favor de la congelación clásica en la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva, con membrana funcional ($P < 0,0001$, para todos los parámetros) y con acrosoma íntegro ($P = 0,001$). A partir de los resultados obtenidos se concluyó que la técnica de congelación clásica fue más efectiva que la congelación ultrarrápida para la criopreservación de semen de chivos de Gabón.

SUMMARY

The low fertility rates obtained in small ruminants with the use of cryopreserved semen has led to the search of alternative semen preservation methodologies, such as the ultrafast sperm freezing. Recently, a new ultrafast freezing technique was developed, previously called kinetic vitrification, for the preservation of sheep and goat semen in the Departamento de Reproducción Animal of INIA (Madrid, Spain). This work is part of a research line developed in collaboration between this institution and the Departamento de Fisiología of the Facultad de Veterinaria (UdelaR). The aim of this study was to compare the effectiveness of ultrafast freezing and classical freezing to conserve semen at different times of the year. During one year semen of 10 adult Gabon bucks was collected on a biweekly basis by electroejaculation. In the fresh samples, we proceeded to the analysis of different seminal parameters, including volume, concentration, mass sperm motility, motility quality, percentage of motile sperm, with progressive motility, functional membrane, percentage of live sperm, normal and with acrosome intact, damaged and lost. Then the fresh semen was purified by centrifugation of density gradients (BoviDilute™ and BoviPure™), and at this stage the motility quality, the percentage of motile spermatozoa, with progressive motility and normal spermatozoa of each one were analyzed. of the processed samples. Once the seminal samples were purified, each was divided into two aliquots. The classic freezing diluent (TCG + 6% yolk + 5% glycerol) was added to one of the aliquots, kept at 5 ° C for 3 h and frozen, in straws, by liquid nitrogen vapors; Before proceeding to its freezing, the same parameters were analyzed as in fresh semen except for volume, concentration and mass sperm motility. To the remaining aliquot of each sample, the same procedure was carried out, except that ultrafast freezing diluent was added (TCG + 6% yolk + 100 mM sucrose), kept at 5 ° C for 30 min and frozen in pellets by placing drops of semen diluted directly in liquid nitrogen. The samples were stored in liquid nitrogen (-196 ° C) in straws (conventional freezing) or in pellets inside cryotubes (ultrafast freezing). After 4 months, they were thawed, and the same parameters as in the diluted semen were analyzed, but in this stage the ISAS system (Integrated Spermatic Analysis System) was used for the evaluation of motility. Then, the semen was passed through a purification column, evaluating the same parameters mentioned above. In addition, blood samples were collected weekly to determine serum testosterone levels. The biweekly data were grouped as monthly means for all the parameters analyzed with mixed models. The serum testosterone concentration was analyzed throughout the months of collection, obtaining significant differences ($P < 0.0001$) and presenting maximum values during the months of April and May. Regarding the seminal parameters, the volume of semen varied throughout the months of collection ($P = 0.002$), reaching its maximum value in the month of July. Significant differences in mass sperm motility were observed throughout the months of collection, decreasing their values from October to November, and then remaining ($P < 0.0001$). The quality of motility varied throughout the months of collection ($P = 0.008$), with a significant increase observed from February to March. The sperm concentration and the percentages of motile sperm, with progressive motility, functional membrane, percentage of live sperm, percentage of normal sperm, and sperm with intact, damaged and lost acrosome did not vary over time. There were significant differences between the techniques in favor of classic freezing when fresh, purified semen was included in the model and once the corresponding classic / ultrafast freezing diluent (semen prior to cryopreservation) was added in the percentage of

spermatozoa with acrosome full ($P < 0.0001$). When the ultrafast / classical thawing stage was considered, using techniques, time, and their interactions as main factors, semen preserved by classical freezing had better motility quality ($P = 0.006$), percentage of motile spermatozoa ($P = 0.0001$), with progressive motility ($P < 0.0001$), with its functional membrane ($P = 0.0007$) and full acrosome ($P = 0.03$). When the thawed semen was analyzed after being purified, significant differences were obtained in favor of the classic freezing in the quality of the motility, the percentage of motile spermatozoa, with progressive motility, with functional membrane ($P < 0.0001$, for all the parameters) and with complete acrosome ($P = 0.001$). From the results obtained, it was concluded that the classic freezing technique was more effective than the ultrafast freezing for the cryopreservation of semen from Gabon bucks.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación neuroendocrina de la reproducción en machos

El hipotálamo es un centro neuronal que permite la modulación de una amplia gama de sistemas fisiológicos, manteniendo un medio interno relativamente constante. El hipotálamo en conjunto con la hipófisis o glándula pituitaria y las gónadas constituyen el llamado eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Este eje es capaz de integrar señales endógenas y señales ambientales o exógenas. Las señales endógenas son aquellas inherentes al propio individuo, como lo son la raza, la especie y el sexo. En cambio, las señales ambientales están relacionadas a la disponibilidad de alimentos, a las relaciones sociales, a la latitud, a los ciclos de luz/oscuridad, a la temperatura, a la humedad y a los períodos de lluvias (Bronson, 1989).

El control primario del eje es ejercido por un decapeptido conocido como hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que se localiza en el área anterior del hipotálamo conocida como área preóptica. En estudios realizados con ratones mutantes *knockout* para el gen que codifica la GnRH se demostró la importancia de esta hormona en relación a la reproducción, ya que la ausencia de GnRH genera hipogonadismo hipogonadotrópico e infertilidad (Mason *et al.*, 1986; Bouligand *et al.*, 2009). La GnRH es producida por un grupo de neuronas hipotalámicas que no forman un núcleo definido pero muestran una organización dispersa en el hipotálamo mediobasal. Los axones de estas neuronas hacen contacto con los vasos porta hipotálamo-hipofisarios y liberan la GnRH en forma pulsátil al torrente sanguíneo en dirección a la adenohipófisis (Marshall *et al.*, 1991). A nivel de la adenohipófisis, la GnRH interactúa con receptores específicos acoplados a proteínas G (GnRHR) presentes en las células gonadotropas, induciendo la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Millar, 2005). La LH y la FSH son glucoproteínas que poseen 2 cadenas proteicas de gran tamaño llamadas alfa y beta. La cadena alfa es igual en ambas moléculas y la cadena beta es la que le da el carácter específico (Pierce y Parsons, 1981). La GnRH cumple un rol fundamental en la regulación de la reproducción al ser la encargada de estimular la secreción de FSH y de LH, que son las hormonas que van a permitir el desarrollo normal de la actividad espermatogénica (ver revisión: Tilbrook y Clarke, 2001).

A nivel del testículo, las dos gonadotropinas (FSH y LH) median sus acciones a través de receptores transmembrana específicos, FSH-R y LH-R respectivamente (Orth y Christensen, 1977). El FSH-R se expresa predominantemente en las células de Sertoli, dentro de los túbulos seminíferos, mientras que el LH-R se expresa en las células de Leydig que poseen una localización intersticial. Tanto la FSH (directamente) como la LH (indirectamente al estimular la secreción de testosterona) actúan sobre la espermatogénesis. La LH es secretada en forma pulsátil, es decir, se secreta en gran cantidad durante períodos breves que se alternan con períodos de reposo en los que alcanza niveles basales de secreción (Muduuli *et al.*, 1979; Clarke y Cummins, 1982). Los cambios bruscos en las concentraciones de LH estimulan a las células de Leydig del testículo, responsables de la secreción de testosterona.

La testosterona es una hormona esteroidea, esencial para la espermatogénesis, pero también participa en la maduración, transporte y eyaculación de los espermatozoides (Griswold y McLean, 2006). Los caracteres sexuales secundarios como el aumento de la masa muscular (a

través de un efecto anabólico sobre el metabolismo proteico), el crecimiento del pelo, la agresividad, entre otros, son dependientes de la testosterona (Hedger y Hales, 2006). Por otra parte, el blanco de acción de la FSH, como se mencionaba anteriormente, son las células de Sertoli, que se ubican en los túbulos seminíferos, las que constituyen un apoyo estructural y generan protección inmunológica para las células germinales (ver revisión: Mruk y Cheng, 2004).

La FSH y la testosterona actúan en las células de Sertoli ejerciendo el control primario de la espermatogénesis. Estudios realizados por el grupo de trabajo de O'Shaughnessy *et al.* (2010) al cruzar ratones hipogonadales con ratones carentes de receptores de andrógenos, revelaron que la FSH aumenta el número de células germinales (espermatogonias y espermatocitos). Además, la acción sinérgica de la FSH y los andrógenos tiene un efecto en la maduración de células germinales meióticas y postmeióticas (Haywood *et al.*, 2003). A partir de otros experimentos realizados con ratones deficientes en la subunidad beta se sugirió que la FSH no es indispensable para mantener la fertilidad (Kumar *et al.*, 1997; Siegel *et al.*, 2013). En este caso el desarrollo sexual es normal, pero disminuye el volumen testicular asociado con una disminución del número de células de Sertoli y de espermatozoides. Por tanto, la presencia de andrógenos es fundamental para que se lleve a cabo una correcta espermatogénesis.

1.2. Estacionalidad reproductiva

Algunas especies de mamíferos presentan cambios estacionales en su actividad reproductiva, incluyendo un período de reposo sexual estacional de intensidad y de duración variables. Las especies con este tipo de reproducción son capaces de restringir la actividad reproductiva al momento del año en el que son capaces de cubrir necesidades energéticas más altas de forma que la parición se produzca en el momento más ventajoso del año. La evolución ha llevado a que en algunas especies la reproducción ocurra durante períodos restringidos del año, influidos fundamentalmente por el clima, la disponibilidad de alimento y las presiones predatorias (Bronson, 1989). Por ello, existen diversos factores que van a influir en la determinación de la época de reproducción, pero la variación de las horas de luz es una de las señales más importantes debido a su alto valor de predictibilidad (Thiéry *et al.*, 2002).

El período de exposición diaria a la luz determina el tiempo de liberación de melatonina (Arendt, 1998). La melatonina es una hormona sintetizada por la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano (Arendt, 1998). La información lumínica es transmitida desde la retina a través del nervio óptico, llegando al núcleo supraquiasmático, y produciendo la síntesis y secreción de melatonina durante las horas de oscuridad. La melatonina actúa a nivel hipotalámico modulando la secreción pulsátil de GnRH (Lincoln, 1992; Malpoux *et al.*, 1997).

En pequeños rumiantes las variaciones en el fotoperiodo son uno de los principales factores medioambientales determinantes en la regulación de la actividad reproductiva. Los ovinos y los caprinos se caracterizan por ser especies con reproducción poliéstrica estacional y su estación reproductiva comienza cuando las horas de luz disminuyen (Evans y Maxwell, 1990). Al aumentar las horas de oscuridad se incrementa el tiempo de liberación de melatonina, lo que provoca un estímulo de liberación de GnRH, y como consecuencia de las gonadotrofinas. Este aumento de secreción de gonadotrofinas va a provocar un aumento del tamaño testicular (Lincoln *et al.*, 1981) de la actividad de las glándulas accesorias (Goeritz *et al.*, 2003) y de la calidad

seminal. En los machos la espermatogénesis no se detiene sino que simplemente disminuye la producción de espermatozoides (Dacheux *et al.*, 1981). Además, en los machos la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal se intensifica unos meses antes de que las hembras comiencen a ciclar (Bronson, 1989) de forma de asegurar la reproducción.

El patrón de reproducción estacional de los caprinos varía en función de la latitud en la que se desarrolló la raza. Aquellos caprinos que se localizan en latitudes altas, mayores a 35°, presentan una marcada estacionalidad reproductiva (Hafez, 1952; Arroyo, 2011). Por el contrario, aquellas razas que habitan la zona ecuatorial o zona mediterránea, presentan una estacionalidad poco marcada e incluso a veces inexistente (Arroyo, 2011).

El Uruguay se encuentra en una zona subtropical, entre los paralelos 30° y 35° de latitud Sur, el sur del Uruguay está en la transición subtropical-templada. La estacionalidad reproductiva de los caprinos ocurre en los meses de verano y todo el otoño-invierno, que es cuando la cantidad de horas de luz disminuye (ver revisión: Menchaca y Ungerfeld, 2010). Los chivos de Gabón son una raza de cabra enana originaria del oeste de África. Oppong y Yebuah (1981) y Kanhum (2006) afirman que esta raza de chivos no es estacional en base a estudios realizados en Ghana y en Pakistán.

En nuestro país se encuentra una población de esta raza de chivos en el “Parque Lecocq” de Montevideo. Los chivos utilizados en esta Tesis provienen de esta población. Se realizaron registros de los nacimientos ocurridos en el Parque Lecocq entre 2005 y 2013, determinándose el patrón anual de partos (Giriboni, 2014). Se observó que los partos se concentran en 2 meses: mayo (finales de otoño) y setiembre (inicio de la primavera) (Figura 1A). Este patrón anual de partos permitió determinar el período de celos fértiles de las hembras (Giriboni, 2014; Figura 1B). Estos antecedentes son los únicos en nuestro país respecto a esta raza de chivos, y en función a ellos se sugiere que poseen una estacionalidad reproductiva poco marcada.

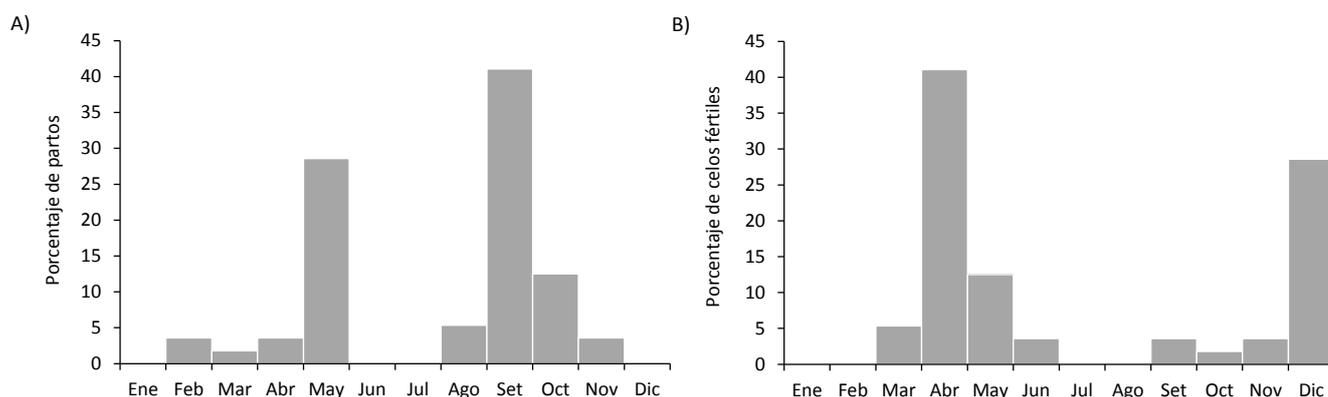


Figura 1. Patrón anual de partos y de celos fértiles calculados en la población de cabras de Gabón del Parque Lecocq, Montevideo, Uruguay, lugar de donde provinieron los machos utilizados en este trabajo. Tomado de Giriboni (2014).

1.3. Influencia de la testosterona sobre los parámetros seminales

La concentración de testosterona plasmática varía estacionalmente (Goeritz *et al.*, 2003; Toledano *et al.*, 2007). El tamaño testicular y las concentraciones de testosterona comienzan a aumentar antes de que comience la estación reproductiva de las hembras (Langford *et al.*, 1987; Delgadillo *et al.*, 2004). La testosterona es una hormona necesaria para el comportamiento sexual

normal, la función testicular y el desarrollo muscular. Los niveles de testosterona controlan tanto la liberación de GnRH como de gonadotrofinas, y por ende su propia secreción, a través de un sistema de retroalimentación negativa. Cuando las concentraciones de testosterona son altas este sistema disminuye su producción debido a la inhibición que se produce sobre el hipotálamo y la adenohipófisis.

Por ende, en las especies con reproducción estacional el período del año es un factor determinante de la calidad seminal de los machos. Por ello se han desarrollado técnicas que permiten minimizar el efecto de la estacionalidad, como ser los bancos de germoplasma (espermatozoides y ovocitos).

1.4. Plasma seminal

El plasma seminal es la fracción líquida del semen, la que es producida por los testículos, el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias a lo largo de su trayecto por las vías genitales masculinas. Las glándulas sexuales accesorias son las encargadas de producir la mayor cantidad del volumen del eyaculado. Los diferentes componentes que darán lugar al plasma seminal van a variar a lo largo de todo su trayecto desde los testículos hasta su excreción, por lo que su composición final podrá ser más o menos dañina para la preservación del semen congelado. Esta variación en la composición del eyaculado generada por los distintos aportes de las glándulas sexuales accesorias es una de las posibles causas que explican la gran variabilidad en la preservación de semen entre distintos machos de una misma especie (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). El plasma seminal influye en algunas características de la membrana del espermatozoide y su crioresistencia (Jobim *et al.*, 2004), en la motilidad (Sias *et al.*, 2005), la capacitación y la reacción acrosómica (Sias *et al.*, 2005), lo que en última instancia afecta su capacidad de fertilización. El plasma seminal también participa en la protección, el mantenimiento y provee de energía a los espermatozoides (Huyen *et al.*, 2018).

El plasma seminal está compuesto por carbohidratos como glucosa y fructuosa, lípidos, proteínas y aminoácidos, hormonas, calcio y enzimas, entre otros. La composición del plasma seminal varía en las diferentes especies. En los chivos, el plasma seminal contiene una fosfolipasa (BUSgp60), secretada por las glándulas bulbouretrales, que puede hidrolizar los fosfolípidos de membrana de los espermatozoides reduciendo su crioresistencia (Pellicer-Rubio y Combarous, 1998). El plasma seminal también reduce la supervivencia espermática debido a la producción de una toxina derivada de los fosfolípidos en los diluyentes que contienen yema de huevo (Sias *et al.*, 2005). Los diluyentes son sustancias de composición más o menos compleja que permiten preservar las características seminales. En un comienzo, Roy (1957) atribuyó el efecto perjudicial del plasma seminal a una enzima secretada por las glándulas bulbouretrales. Debido a que esta enzima indujo la coagulación de la yema de huevo se la llamo “enzima coaguladora de yema de huevo” (*egg yolk-coagulating enzyme*). Más tarde, se propuso que una proteína de unos 40-60 kDa secretada por la glándula bulbouretral era la responsable de este efecto (Nunes *et al.*, 1982). Finalmente esta proteína fue purificada por Pellicer-Rubio *et al.* (1998).

Kozdrowski *et al.* (2007) demostraron que la eliminación del plasma seminal mejora la motilidad espermática antes de un procedimiento de criopreservación. La centrifugación y la remoción parcial del plasma seminal previo a su refrigeración a 5°C resultan en una mejoría en los

parámetros de motilidad espermática. Esto sugiere que es necesaria una baja concentración de plasma seminal, o el uso de un sustituto de éste, para mantener las características de motilidad espermática (Rigby *et al.*, 2001; Akcay, 2006). La forma más efectiva de remoción del plasma seminal en chivos, es el uso de centrifugación por gradientes de densidad (Santiago-Moreno *et al.*, 2017). La adición de yema de huevo al diluyente antes de la congelación tiene efectos positivos en el metabolismo espermático (Aboagla y Terada, 2004; Dziekonska *et al.*, 2017), razón por la que se sigue utilizando yema de huevo en los protocolos de congelación clásica.

Además la estacionalidad genera cambios en la secreción por parte de las glándulas accesorias que pueden influir en el volumen secretado y en la composición del plasma seminal (Strzerek, 2002), así como en la variable respuesta estacional de los espermatozoides a los procesos de congelación, cuando se utilizan diluyentes con yema de huevo (Coloma *et al.*, 2010a). Existen cambios estacionales en la composición de las proteínas del plasma seminal (La Falci *et al.*, 2002), pero también hay variaciones en la concentración de calcio, fósforo y colesterol (Dias *et al.*, 2017).

1.5. Criopreservación espermática

La criopreservación espermática es una técnica que permite el almacenamiento de espermatozoides durante un tiempo indefinido (Gao y Critser, 2000). El uso de semen criopreservado ha optimizado su uso por parte de los productores ganaderos, mejorado programas genéticos y permitido la conservación de recursos zoogenéticos (Gómez *et al.*, 2006). Sin embargo, la principal desventaja de la criopreservación es la disminución de la fertilidad en comparación con el semen fresco debido a los cambios morfo-funcionales que experimentan los espermatozoides (Maxwell y Watson, 1996; ver revisión: Stornelli *et al.*, 2005).

Los espermatozoides sometidos a esta técnica disminuyen la calidad de su motilidad (Kayser *et al.*, 1992; Leboeuf *et al.*, 2000). Además durante el proceso de congelación/descongelación se produce una desestabilización de la membrana celular que desencadena la reacción acrosómica (Vázquez, 2002). Esta reacción acrosómica es un proceso fisiológico clave para la fertilización, pero también puede generarse debido a un deterioro celular por el uso de agentes físicos o químicos (Tasseron *et al.*, 1977), por lo que luego los espermatozoides serán menos fértiles. Por ello es importante el uso de protocolos adecuados de criopreservación.

A lo largo de los años se han desarrollado diversas técnicas que permiten disminuir el daño celular. Actualmente hay dos métodos de criopreservación (Arav, *et al.*, 2002): la congelación clásica y la vitrificación, técnica actualmente en desarrollo. El método de congelación de semen clásico consiste en someter a las células a un proceso de enfriamiento progresivo. A bajas temperaturas el metabolismo celular disminuye, permitiendo la conservación de células a largo plazo (Gao y Critser, 2000). Sin embargo, el proceso de congelación/descongelación afecta la calidad y viabilidad de los espermatozoides, especialmente en pequeños rumiantes, y por tanto, disminuye las tasas de fertilidad cuando dicho semen es utilizado para inseminar. Básicamente, el proceso genera daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que afectan a los espermatozoides (Leboeuf *et al.*, 2000). En cambio, la vitrificación se basa en la solidificación del medio y de las células debido a un aumento de la viscosidad evitando la formación de cristales de

hielo (Bajo y Coroleu, 2009). En dicha técnica, las células son sometidas a un enfriamiento brusco, lo que simplifica enormemente el proceso práctico.

1.5.1. Factores que afectan el resultado de la criopreservación espermática

Durante la etapa de congelación–descongelación los espermatozoides experimentan varios ciclos de deshidratación e hidratación; estos cambios de volúmenes están asociados a las concentraciones de iones y electrólitos tanto dentro como fuera de la célula (Leivo y Bradley, 1999). Los cambios de volumen son uno de los factores que afectan la viabilidad de los espermatozoides y que explican por qué la fertilidad del semen congelado es menor a la del semen fresco (Tittarelli, 2014). Por tanto, existen diversos factores que influyen en la criopreservación espermática, como la velocidad de enfriamiento, el shock de frío, la composición de los diluyentes y el estrés osmótico (Morris *et al.*, 2012).

Un enfriamiento lento genera estrés sobre la membrana celular, lo que se relaciona con cambios en la fase lipídica de la membrana, lo que a su vez altera su funcionalidad. Una forma de disminuir el efecto del shock de frío es incluir yema de huevo en el diluyente a emplear. La yema de huevo posee lipoproteínas de baja densidad capaces de generar una película protectora al unirse a los espermatozoides (Kampscmidt *et al.*, 1953; Watson, 1976; Quinn, *et al.*, 1980; Graham y Foote, 1987, Dziekońska *et al.*, 2017) minimizando el daño por shock de frío.

Para lograr una mayor tasa de supervivencia espermática durante el proceso de congelación-descongelación es importante seleccionar los crioprotectores más adecuados en los diluyentes a utilizar (Criste, 2011). Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico del semen diluido (García y Vila, 1984). El descenso del punto eutéctico implica que los espermatozoides alcanzan la máxima concentración de solutos a una menor temperatura permitiendo que los espermatozoides se deshidraten y sufran un menor estrés osmótico (Boiso, 2001). El crioprotector más utilizado es el glicerol, pero genera estrés osmótico siendo capaz de estimular la reacción acrosómica. El glicerol ingresa al espermatozoide a través de un canal de acuaporina denominado acuaporina 7 (Ishibashi, *et al.*, 1997) y de esta forma reemplaza el agua intracelular. El ingreso de glicerol a la célula, en conjunto con una velocidad de enfriamiento lenta, reducen la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos (Salamon y Maxwell, 2000). Gao *et al.* (1993) demostraron que el estrés generado por el glicerol puede reducirse incorporando el glicerol en etapas durante el proceso de criopreservación.

También hay factores que influyen en la buena conservación de esas células, pero que están relacionados a la propia especie, raza e individuo (Thurston *et al.*, 2002; Criste, 2011), presentándose variaciones incluso entre los eyaculados del mismo individuo. Estas variaciones se deben a diferencias en la composición de lípidos de la membrana celular espermática y en la composición del plasma seminal de cada individuo. Además, en especies con reproducción estacional como los ovinos y los caprinos, la secreción de las principales hormonas reproductivas (gonadotrofinas y testosterona), así como las variables seminales anteriores se modifican en forma importante a lo largo del año (Dufour *et al.*, 1984; Hellgren *et al.*, 1989; Hammoudi *et al.*, 2010; Sarlós *et al.*, 2013). La intensificación de la actividad reproductiva previo al comienzo de la estación es capaz de aumentar favorablemente los parámetros seminales por lo que los espermatozoides producidos durante este período tienen una mayor crioresistencia que aquellos

producidos fuera de la estación reproductiva. Sin embargo, se ha sugerido que la testosterona en altas concentraciones es capaz de hacer más inestables los procesos deletéreos que acontecen durante la congelación-descongelación concretamente aquellos relacionados con los cambios de volumen celular, con la salida y entrada de agua, y del crioprotector (Coloma *et al.*, 2010b). Por lo que el semen colectado previo a la estación reproductiva va a poseer una menor crioresistencia en parte debida al aumento de testosterona.

1.5.2. Vitricación espermática (“congelación ultrarrápida”)

La vitricación es la solidificación de un líquido provocada por un aumento de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy, 1984) y sin la formación de cristales de hielo (Luyet y Hoddap, 1938). Existen 3 factores que van a influir sobre el proceso de vitricación: la velocidad de enfriamiento, la viscosidad y el volumen. Una disminución del volumen y un aumento tanto de la velocidad de enfriamiento como de la viscosidad favorecerán una mejor vitricación (Arav *et al.*, 2002).

En estudios previos realizados por el grupo de trabajo dirigido por Julián Santiago-Moreno (INIA, Madrid, España) se mejoró el resultado de la técnica de vitricación cinética con la invención de un dispositivo patentado (DDP70®) para calentar rápidamente la muestra vitrificada. La vitricación en equilibrio, en conjunto con altas concentraciones de crioprotectores, determinó bajos resultados de viabilidad espermática. Sin embargo, debido a que con volúmenes pequeños la tasa de enfriamiento es mayor (Bajo y Coroleu, 2009), se lograron buenos resultados de viabilidad seminal al utilizar velocidades ultrarrápidas (mayores a 10.000 °C/min) mediante la inmersión de pequeños volúmenes de muestras seminales diluidas con medios vitrificantes en nitrógeno líquido. En este sentido, un porcentaje importante de los espermatozoides sometidos a vitricación/calentamiento son capaces de mantener su capacidad fecundante, y por tanto, de que se logre una buena tasa de fertilidad (Pradiee *et al.*, 2015). Sin embargo, en estudios recientes realizados en el INIA (Madrid, España) se ha demostrado la formación de cristales de hielo en el medio extracelular de los espermatozoides, al menos cuando se utilizan volúmenes de 50 µl, razón por la que esta técnica pasó a denominarse “congelación ultrarrápida”, debido a que no se logra la vitricación del medio. La implementación de la congelación ultrarrápida para conservar el semen de animales de producción tiene como ventaja práctica la sencillez de su aplicación. Por tanto, la congelación ultrarrápida se presenta como una alternativa a la congelación clásica.

2. HIPÓTESIS

La congelación ultrarrápida es una alternativa a la congelación clásica que permite alcanzar buenos resultados de preservación espermática a lo largo del año en chivos.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general*

Comparar la efectividad de la congelación ultrarrápida (CU) y la congelación clásica (CC) de semen de chivos de Gabón colectado durante todo el año.

3.2. *Objetivos específicos*

- Analizar y comparar a lo largo del año, las muestras seminales frescas, luego de purificadas, luego de agregado el correspondiente diluyente, una vez descongeladas mediante la técnica de CU/CC, y luego de ser purificadas nuevamente.
- Comparar a lo largo del año los daños celulares (calidad de la motilidad, porcentajes de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, porcentaje con integridad de su acrosoma, porcentaje de espermatozoides vivos, con su membrana funcional y morfológicamente normales) generados por la CU y la CC.
- Analizar las variaciones de testosterona plasmática a lo largo del año y su asociación con el resultado de la CU y CC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales y su manejo

Se utilizaron 10 chivos de Gabón adultos, de 7 a 9 años de edad y con un peso corporal de $30,6 \pm 1,6$ kg (media \pm EE) durante un período de 12 meses. Los chivos se mantuvieron en corrales de 15 x 10 m, en las instalaciones del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria. Los animales fueron alimentados con fardos de alfalfa y dispusieron de agua *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria.

4.2. Colección seminal

Se colectaron muestras seminales en forma quincenal mediante electroeyaculación. El semen se colectó utilizando una sonda rectal de 300 mm de largo x 9 mm de diámetro, con 3 electrodos longitudinales de cobre de 30 mm de longitud (Fuhijira Industry, Tokyo, Japan) realizando series de 10 pulsos (4-5 s por pulso) de estímulo, con intervalos de descanso de 2-3 s por serie. La intensidad del voltaje fue en aumento desde 1 V hasta la eyaculación. Previo a realizar la electroeyaculación, se vació el recto de heces y se lavó el prepucio para evitar que se contaminara la muestra seminal. Una vez obtenida la muestra seminal, se la dividió en dos alícuotas. Una de ellas se congeló mediante la técnica de congelación ultrarrápida (CU) y la otra alícuota de la muestra se congeló con el procedimiento tradicional (CC), y se evaluaron parámetros seminales de semen fresco, purificado, luego de agregado el diluyente de CU/CC, una vez descongelado mediante la técnica CU/CC, y luego de ser purificados nuevamente.

4.3. Evaluación de semen fresco y purificado

Una vez colectado el semen se procedió a la evaluación inmediata de cada muestra. En primer lugar, se determinó la motilidad espermática de masa (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China con un aumento de 4x) asignándose una escala entre 0 y 5 de acuerdo a la cantidad de remolinos y la velocidad de movimiento de los mismos. La calidad de la motilidad se determinó, asignando una escala que va del 0 al 5, siendo 0 cuando no hay movimiento de espermatozoides y 5 cuando el movimiento es muy rápido (Fernández *et al.*, 2013) y también se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva. Se evaluó la funcionalidad de la membrana utilizando una solución hipoosmótica (HOST) que luego de incubada se fijó en formol- citrato (Jeyendran *et al.*, 1984). También se fijó una muestra en formol- citrato para posteriormente determinar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de espermatozoides con integridad acrosómica. Se colocó una gota de la muestra colectada junto con una gota de eosina-nigrosina, en un portaobjetos para realizar un frotis y evaluar vitalidad espermática.

Antes de realizar la dilución de la muestra seminal, se procedió a realizar una purificación previa con Bovipure y Bovidilute (Nidacon, Mölndal, Suecia). Para ello, se determinó la concentración de espermatozoides a partir de la muestra fijada en formol- citrato en la cámara de

Neubauer. La utilización de diferentes volúmenes de Bovipure y Bovidilute permitió la preparación del gradiente de densidad: Bottom (8 mL Bovipure + 2 mL Bovidilute) y Top (4 mL Bovipure + 6 mL Bovidilute). Luego, se procedió a añadir un 1mL de la columna de purificación (0,5 mL de Bottom y 0,5 mL de Top) por cada 333×10^6 espermatozoides presentes en la alícuota. En un tubo falcon limpio se agregó el volumen calculado de Bottom, y a continuación, con mucho cuidado se añadió el volumen de Top, dejándolo escurrir por la pared del tubo. Por último se añadió todo el volumen de semen colectado y se procedió a centrifugar a 2000 rpm (300 G) durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante del tubo, dejando el pellet para analizar.

A partir de este pellet se evaluó la calidad de la motilidad, se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos, y se realizó una fijación en formol-citrato para evaluar el porcentaje de espermatozoides normales.

4.4. Adición del diluyente, congelación clásica, descongelación y purificación

A partir de la muestra fijada en formol-citrato se determinó la concentración espermática en la cámara de Neubauer, y se calculó el total de espermatozoides en el eyaculado. Se utilizaron pajuelas de 0,25 mL en las que se incluyó una concentración de 100 millones de espermatozoides. De esta forma se calculó la cantidad de diluyente necesaria para criopreservar un mínimo de 4 pajuelas de semen.

Las muestras fueron diluidas con un diluyente TCG (pH 6,9; 345 mOsm/kg) preparado previamente en el Laboratorio de Fisiología de Facultad de Veterinaria, constituido por Tris (313,7 mM), ácido cítrico (104,7 mM) y glucosa (30,3 mM) al que se le añadía como aditivo yema de huevo (6%, v/v) y glicerol como crioprotector penetrante (5%, v/v). Las muestras permanecieron a 5 °C durante 3 h, y posteriormente se evaluaron los mismos parámetros que con el semen fresco. Luego se colocaron las muestras en pajuelas, y éstas fueron colocadas en vapores de nitrógeno (-80 °C) durante 10 min, y por último, se las colocó directamente en nitrógeno líquido (-196 °C) para poder almacenarlas en el tanque de nitrógeno antes de su descongelación.

Las muestras se mantuvieron congeladas durante 4 meses y al momento de la descongelación se evaluaron los mismos parámetros que en el semen fresco, utilizándose los mismos criterios. Además, para la motilidad espermática se realizó una evaluación mediante el sistema ISAS (Sistema Integrado de Análisis Espermático, ISAS V1, PROISER, Valencia, España). Para la descongelación se retiraron las pajuelas del nitrógeno líquido, manteniéndolas durante 10 s a temperatura ambiente y colocándolas a 37 °C durante 30 s. Luego se secaron las pajuelas y se cortó uno de los extremos, colocándola en un tubo eppendorf, para posteriormente cortar el otro extremo para liberar el semen. Además se realizó la purificación de estas muestras (de la misma forma que se realizó con el semen fresco) y se evaluaron los mismos parámetros seminales que en el semen fresco y descongelado; también se utilizó el sistema ISAS para evaluar los parámetros de motilidad espermática.

4.5. Adición del diluyente, congelación ultrarrápida, descongelación y purificación

Para la CU, se adicionó el diluyente correspondiente (TCG + 6% yema de huevo + 100 mM sucrosa) a la segunda alícuota seminal. Las muestras fueron colocadas durante 30 min a 5 °C, y se

evaluaron las mismas características que en las muestras con diluyente de congelación. La CU se realizó en pellets mediante la disposición de gotas de 50 μ L de la muestra espermática diluida directamente sobre nitrógeno líquido. Los pellets fueron almacenados en criotubos para luego ser colocados en el tanque de nitrógeno.

La descongelación se realizó a una temperatura de entre 65 y 70 °C mediante un dispositivo de descongelación ultrarrápida (DDP70; Figura2). Primero se procedió a abrir los criotubos dentro del nitrógeno líquido y los pellets se colocaron en un colador. Luego, con mucho cuidado se tomó cada uno de los pellets y con una pinza se colocaron en el DDP70 en forma individual. Al contacto con la paleta caliente del DDP70 los pellets se convirtieron en gotas que cayeron a un vaso de bohemia colocado por debajo de las paletas del DDP70. Al momento de la descongelación ultrarrápida (DU) se analizaron las mismas características seminales que en la descongelación clásica (DC), y se utilizó el sistema ISAS para determinar motilidad espermática. Finalmente, se procedió a la fijación de muestras y su purificación.

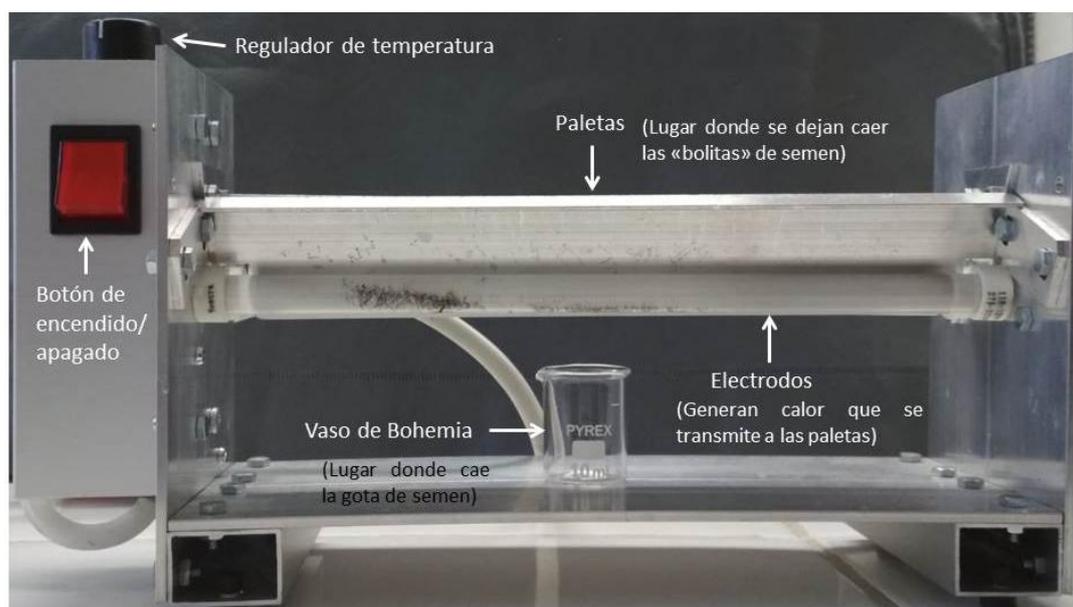


Figura 2. Dispositivo de descongelación ultrarrápida (DDP70)

4.6. Colección de sangre y medición sérica de testosterona

Se colectó sangre semanalmente, siempre a las 08:00 am, por venopunción yugular. Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, se centrifugaron durante 10 min a 300 G. Luego se extrajo el suero, el que se almacenó en tubos eppendorf a -20°C para la posterior medición de testosterona sérica mediante radioinmunoanálisis (RIA).

El análisis de RIA se realizó en el Departamento de Reproducción Animal del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, España). Se utilizaron alícuotas de suero de 100 μ L por duplicado tal como se describió previamente (Santiago-Moreno *et al.*, 2005). Luego, se procedió a la medición de cada una de las muestras en el Contador de Centelleo Líquido (TRI-CARB 2100TR), incluyéndose la medición de la curva patrón. El límite de detección del ensayo fue de 0,02 nmol/L y el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 18% y el inter-ensayo de 13%.

4.7. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS (Statistical Analysis Software, Visual Statistics, Carolina del Norte, EEUU) utilizándose un modelo mixto. Los datos quincenales se agruparon como medias mensuales para todos los parámetros analizados. Se realizó un análisis de los parámetros de semen fresco considerando como factor principal el tiempo correspondiente a los meses de colección. Para el análisis de concentración sérica de testosterona también se consideró al tiempo como el factor principal.

Se analizaron los parámetros seminales a lo largo de las diferentes etapas del proceso de criopreservación. En un análisis se consideró como factores principales las técnicas (CU/CC), las etapas de semen previas a la criopreservación (semen: fresco, purificado y una vez añadido el correspondiente diluyente de CU/CC), y el tiempo (que corresponde a los meses de colección). Además se consideraron las respectivas interacciones entre los distintos factores. En otro de los análisis, se consideró la etapa de DU/DC, utilizándose como factores principales las técnicas (CU/CC) y el tiempo (correspondiente a los meses de colección), junto con sus respectivas interacciones. Se realizó otro análisis únicamente de la etapa de purificación del semen DU/DC, en la que se consideró como factores principales a las técnicas (CU/CC) y el tiempo (correspondiente a los meses de colección), junto con sus respectivas interacciones.

5. RESULTADOS

5.1. Cambios estacionales en la concentración de testosterona y las características del semen fresco

Las concentraciones de testosterona variaron de acuerdo al mes ($P < 0,0001$; Figura 3). Se observó un aumento progresivo del valor de la concentración de testosterona de octubre a enero, alcanzándose valores máximos en abril y mayo.

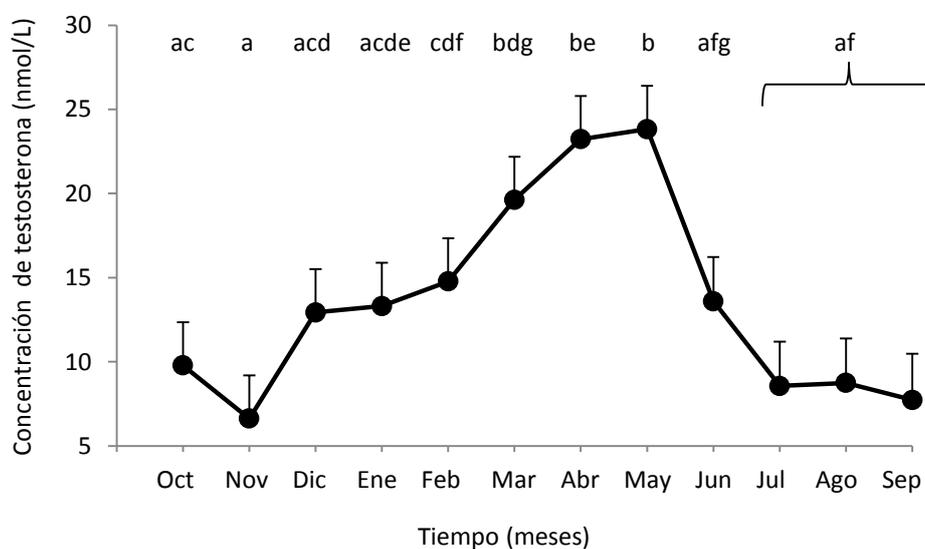


Figura 3. Concentración de testosterona de muestras de suero sanguíneo de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de suero sanguíneo. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección $P < 0,05$.

5.1.1. Parámetros seminales de semen fresco

El volumen de semen varió a lo largo de los meses de colección ($P = 0,002$; Figura 4A). El patrón general indica un aumento progresivo de los valores hasta el mes de junio, alcanzando su valor máximo en el mes de julio. Se observaron diferencias significativas en la motilidad espermática en masa a lo largo de los meses de colección, disminuyendo sus valores desde octubre a noviembre, para luego mantenerse ($P < 0,0001$; Figura 4B). La calidad de la motilidad varió a lo largo de los meses de colección ($P = 0,008$; Figura 4C), observándose un aumento significativo de febrero a marzo que luego se mantuvo. La concentración espermática y los porcentajes de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva, con membrana funcional, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides normales, y de espermatozoides con acrosoma íntegro, dañado y perdido no variaron a lo largo del tiempo.

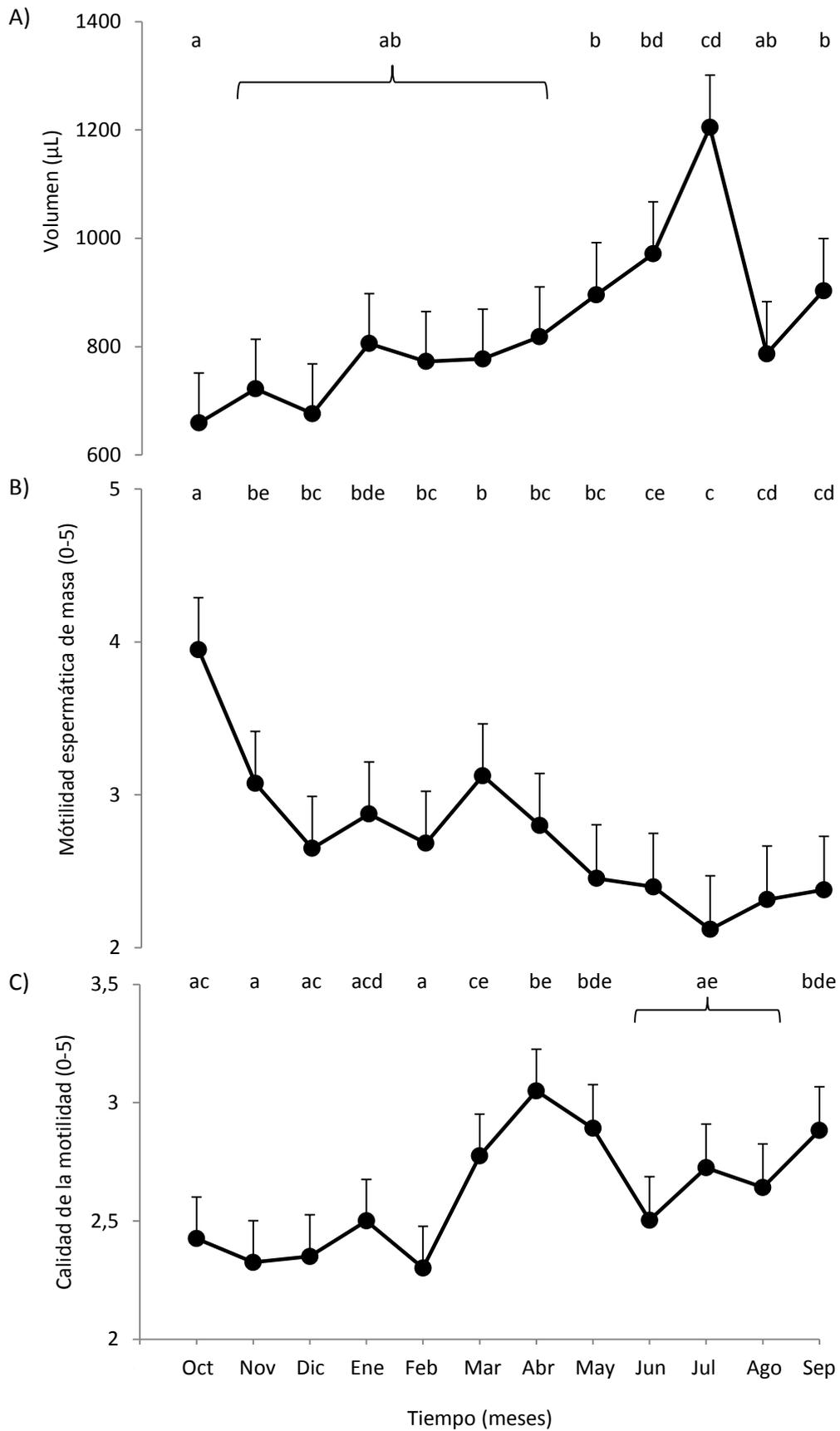


Figura 4. Parámetros de semen fresco de chivos de Gabón a lo largo de los meses de colección. A) Volumen de semen eyaculado (µL), B) motilidad espermática en masa (0-5) y C) calidad de la motilidad (0-5). Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, calculándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección (P<0,05).

Los efectos principales para cada uno de los parámetros seminales analizados se presentan en las Tablas 1 y 2. Todos los parámetros seminales variaron de acuerdo a los meses de colección y de las distintas etapas antes de la criopreservación, pero solamente el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro fue mayor en las muestras procesadas mediante la técnica de CC que con la CU.

En la etapa de semen DC/DU todos los parámetros (a excepción del porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado) variaron de acuerdo a los meses del año. Se observó interacción entre las técnicas empleadas y los meses de colección en la calidad de la motilidad, los porcentajes de espermatozoides móviles, con membrana funcional, de espermatozoides vivos y de espermatozoides normales.

En la etapa de semen purificado luego de DC/DU todos los parámetros (a excepción de los porcentajes de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva y con acrosoma perdido) variaron de acuerdo a los meses del año. Además, todos los parámetros (a excepción del porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro, dañado o perdido) presentaron interacción entre las técnicas de almacenamiento empleadas y los meses de colección.

Tabla 1.

Efectos principales de la técnica de criopreservación (Tc), tiempo (ti), y etapas (et), así como sus respectivas interacciones en la calidad de la motilidad y los porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva en chivos.

Parámetros seminales	Tc	Ti	et	Tc*ti	Tc*et	Tc*ti*et
Semen previo a la criopreservación						
Espermatozoides móviles (%)	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0003	ns
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0002	ns
Calidad de la motilidad (0-5)	ns	<0,0001	0,03	ns	0,01	<0,0001
Semen descongelado/desvitrificado						
Espermatozoides móviles (%)	<0,0001	<0,0001	-	0,02	-	-
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	0,0007	<0,0001	-	ns	-	-
Calidad de la motilidad (0-5)	0,006	<0,0001	-	0,01	-	-
Semen purificado luego de ser descongelado/desvitrificado						
Espermatozoides móviles (%)	<0,0001	Ns	-	0,003	-	-
Espermatozoides con motilidad progresiva (%)	<0,0001	Ns	-	0,0002	-	-
Calidad de la motilidad (0-5)	<0,0001	0,002	-	0,01	-	-

ns: diferencias no significativas

Tabla 2.

Efectos principales de la técnica de criopreservación (Tc), tiempo (ti), y etapas (et), así como sus respectivas interacciones en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, dañado y perdido en chivos.

Parámetros seminales	Tc	ti	et	Tc*ti	Tc*et	Tc*ti*et
Semen previo a la criopreservación						
Espermatozoides con membrana funcional (%)	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	<0,0001
Espermatozoides vivos (%)	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	0,02
Espermatozoides normales (%)	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	<0,0001
Espermatozoides con acrosoma íntegro(%)	<0,0001	0,005	<0,0001	ns	<0,0001	0,0001
Espermatozoides con acrosoma dañado (%)	<0,0001	0,04	<0,0001	ns	<0,0001	0,0004
Espermatozoides con acrosoma perdido(%)	0,01	0,02	<0,0001	ns	<0,0001	ns
Semen una vez descongelación/desvitrificación						
Espermatozoides con membrana funcional (%)	0,0007	<0,0001	-	<0,0001	-	-
Espermatozoides vivos (%)	ns	<0,0001	-	0,0001	-	-
Espermatozoides normales (%)	ns	<0,0001	-	0,03	-	-
Espermatozoides con acrosoma íntegro(%)	0,03	0,0002	-	ns	-	-
Espermatozoides con acrosoma dañado (%)	ns	ns	-	ns	-	-
Espermatozoides con acrosoma perdido(%)	ns	0,005	-	ns	-	-
Semen purificado luego de ser descongelado/desvitrificado						
Espermatozoides con membrana funcional (%)	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	-
Espermatozoides vivos (%)	ns	0,001	-	<0,0001	-	-
Espermatozoides normales (%)	ns	<0,0001	-	0,002	-	-
Espermatozoides con acrosoma íntegro(%)	0,001	<0,0001	-	ns	-	-
Espermatozoides con acrosoma dañado (%)	0,04	0,001	-	ns	-	-
Espermatozoides con acrosoma perdido(%)	0,004	ns	-	ns	-	-

5.2. Efectos de las etapas de los procesos de criopreservación

5.2.1. Porcentaje de espermatozoides móviles

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, se presentaron diferencias significativas a lo largo de las etapas ($P<0,0001$; Figura 5) y de los meses de colección ($P<0,0001$; Figura 6A), pero no de acuerdo a la técnicas. Además, hubo una interacción entre las técnicas y las diferentes etapas ($P=0,0003$): el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor mediante la técnica de CC en comparación a la CU en la etapa de purificación luego de la DC/DU ($P=0,0007$). No se observó interacción entre las técnicas y el tiempo, ni entre las técnicas, tiempo y etapas.

En la etapa de semen DC/DU, el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor en las muestras que se procesaron mediante la técnica de CC que con la CU ($21,0 \pm 1,5 \%$ vs $9,0 \pm 1,5 \%$; $P < 0,0001$). El porcentaje de espermatozoides móviles varió a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 6B), habiendo una interacción entre las técnicas y los meses de colección ($P = 0,02$). Los meses en los que hubo diferencias a favor de la CC fueron octubre ($P < 0,0001$), diciembre ($P = 0,0008$), enero ($P = 0,008$), marzo ($P < 0,0001$), abril ($P < 0,0001$) junio ($P = 0,04$) y septiembre ($P = 0,002$).

En la etapa de semen purificado una vez DC/DU no hubo variación en el porcentaje de espermatozoides móviles de acuerdo al mes, pero el mismo fue mayor mediante la CC que con la CU ($23,2 \pm 1,7 \%$ vs $10,2 \pm 1,7 \%$; $P < 0,0001$). Existió interacción entre las técnicas y los meses de colección ($P = 0,003$; Figura 6C), observándose diferencias a favor de la CC en los meses de noviembre ($P = 0,0003$), diciembre ($P = 0,0005$), enero ($P = 0,0001$), febrero ($P = 0,03$), abril ($P < 0,0001$), mayo ($P = 0,03$) y septiembre ($P = 0,006$).

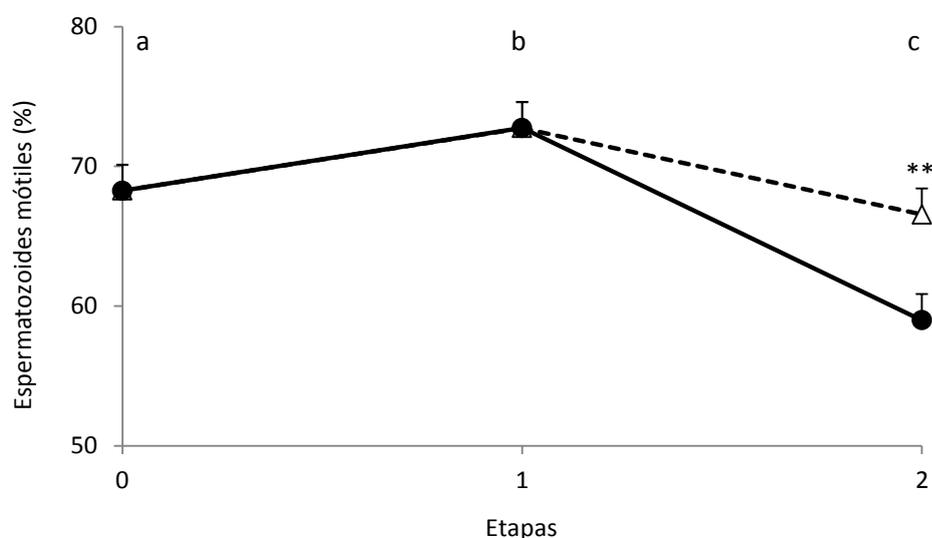


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides móviles previo al proceso de congelación/descongelación muestras diluidas con TCG-yema huevo-sucrosa (técnica ultrarrápida, -●-) y con TCG-yema de huevo-sucrosa (técnica clásica, -Δ-) de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU). Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, para cada etapa se promediaron todo los meses de colección. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de las etapas ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y las etapas se indican como: ** ($P < 0,01$).

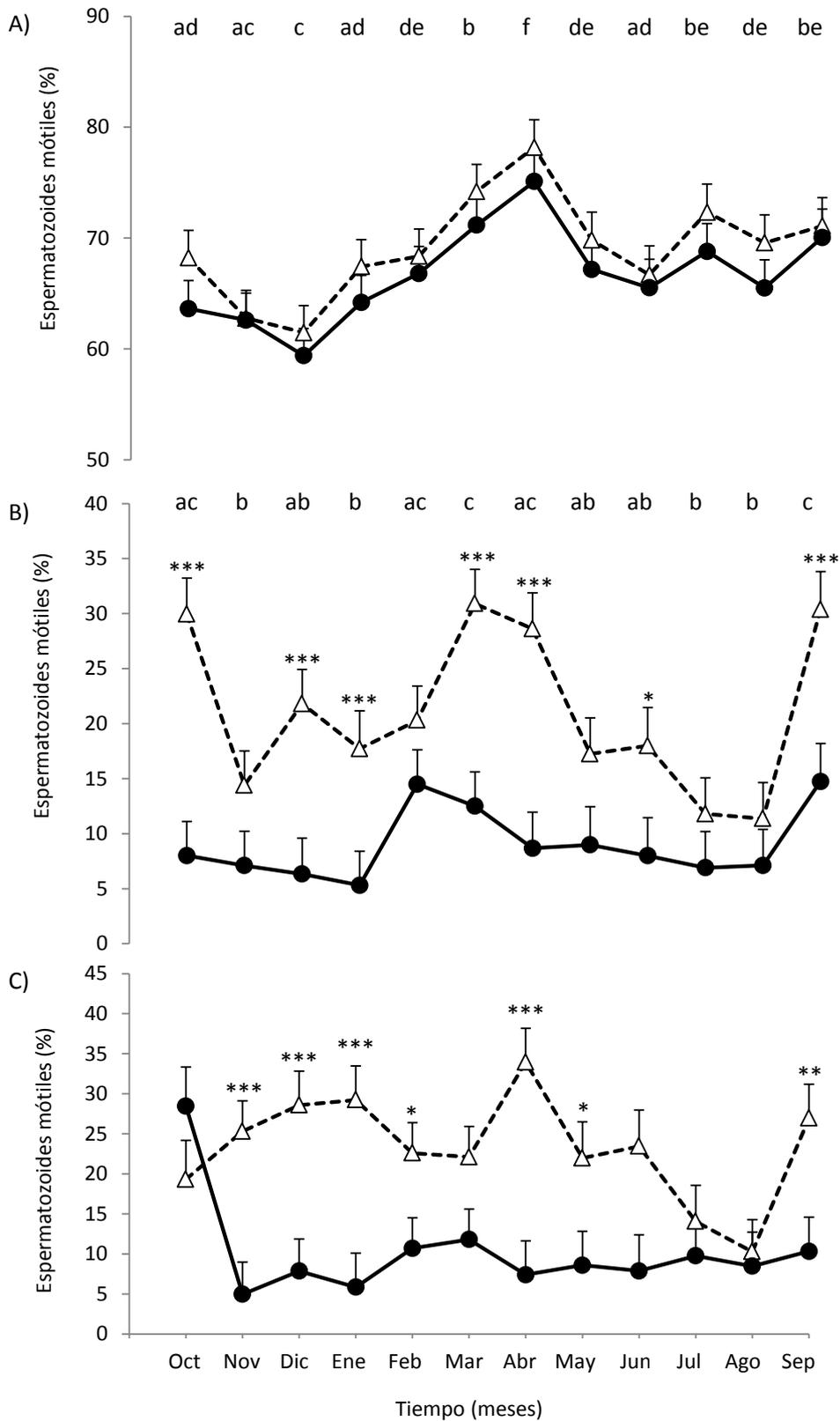


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides móviles criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (●) y de congelación clásica (Δ) de chivos de Gabón a lo largo de los meses de colección. A) Semen previo a la criopreservación, B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Los espermatozoides almacenados mediante la técnica de congelación se criopreservaron mejor que con la técnica de vitrificación (B: $P < 0,0001$; C: $P < 0,0001$). Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de descongelado/desvitrificado. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), y *** ($P < 0,001$).

5.2.2. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva

Previo a la criopreservación no hubo diferencias significativas entre las técnicas. Hubo variación de acuerdo a las etapas ($P < 0,0001$; Figura 7) y de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 8A) en el semen previo a la criopreservación. Además se presentó una interacción entre las técnicas y las diferentes etapas ($P = 0,0002$): el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor mediante la CC que con la CU en la etapa de purificación luego de la DC/DU ($P = 0,006$). No se observó interacción entre las técnicas y el tiempo, ni interacción entre técnicas, tiempos y etapas.

En la etapa de semen DC/DU, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor mediante la CC que con la CU ($15,3 \pm 1,2 \%$ vs $5,2 \pm 1,2 \%$; $P < 0,0001$). Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de acuerdo a los meses ($P < 0,0001$; Figura 8B), pero sin interacción entre las técnicas empleadas.

En la etapa de semen purificado una vez DC/DU el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue mayor mediante la técnica de CC que con la CU ($17,2 \pm 1,4 \%$ vs $6,4 \pm 1,3 \%$; $P < 0,0001$; Figura 8C), sin diferencias de acuerdo al mes de colección. Se presentaron interacciones entre las técnicas y los meses de colección ($P = 0,0002$), siendo diferentes a favor de la CC en octubre ($P = 0,03$), noviembre ($P = 0,0009$), diciembre ($P = 0,0004$), enero ($P = 0,0001$), abril ($P < 0,0001$), mayo ($P = 0,006$), junio ($P = 0,007$) y septiembre ($P = 0,002$).

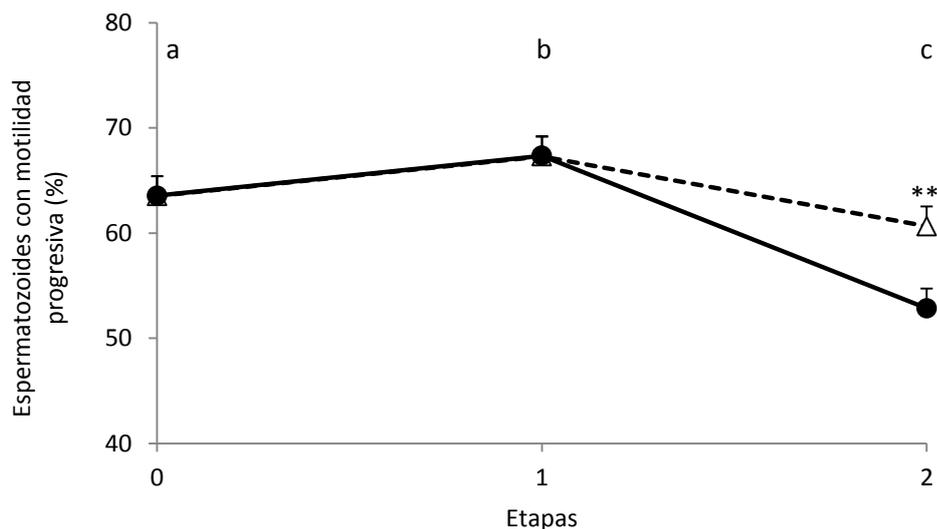


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva previo al proceso de congelación/descongelación muestras diluidas con TCG-yema huevo-sucrosa (técnica ultrarrápida, -●-) y con TCG-yema de huevo-sucrosa (técnica clásica, -Δ-) de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU). Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, para cada etapa se promediaron todos los meses de colección. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de las etapas de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y las etapas se indican como: ** ($P < 0,01$).

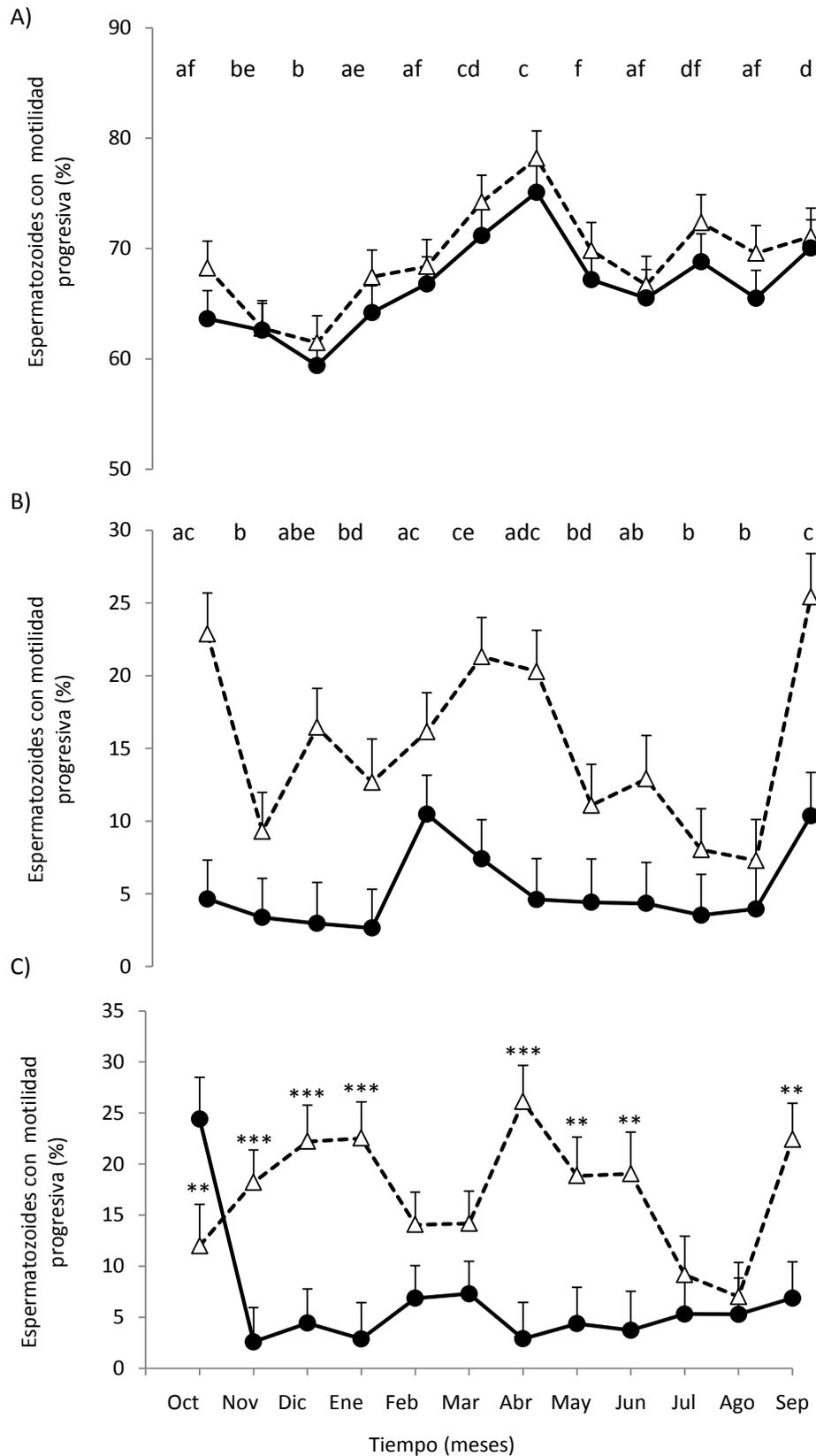


Figura 8. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de descongelado/desvitrificado. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: ** ($P < 0,01$), y *** ($P < 0,001$).

5.2.3. Calidad de la motilidad

Al evaluar el semen previo a la criopreservación hubo diferencias significativas a lo largo de las etapas ($P=0,03$; Figura 9) y de los meses de colección ($P<0,0001$; Figura 10A), no habiendo diferencias entre las técnicas empleadas. Además hubo interacción entre las técnicas y las diferentes etapas ($P=0,01$): el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor mediante la técnica de CC que la CU en la etapa de purificación luego de DC/DU ($P=0,04$). Además se presentó interacción entre los técnicas, los tiempos de colección y las diferentes etapas ($P<0,0001$). Sin embargo no existió interacción entre los tratamientos y los meses de colección.

En la etapa de semen DC/DU la calidad de la motilidad de los espermatozoides procesados mediante la técnica de CC fue mejor que la de aquellos procesados mediante la técnica de CU ($1,6 \pm 0,2$ vs $0,9 \pm 0,2$; $P= 0,005$). La calidad de la motilidad varió a lo largo de los meses de colección ($P<0,0001$; Figura 10B), y existió una interacción entre las técnicas de criopreservación empleadas y los meses de colección ($P= 0,01$), observándose un aumento significativo de la calidad de los espermatozoides procesados mediante la técnica de CC en comparación a los CU durante los meses de octubre ($P=0,002$), diciembre ($P=0,01$), enero ($P=0,001$), marzo ($P=0,04$), abril ($P<0,0001$) y septiembre ($P=0,009$).

En la etapa de semen purificado una vez DC/DU, la calidad de la motilidad fue mayor mediante la técnica de CC, que con la técnica de CU ($1,6 \pm 0,09$ vs $0,7 \pm 0,09$; $P<0,0001$), y varió a lo largo de los meses de colección ($P=0,002$; Figura 10C). Además se observó una interacción entre las técnicas y los meses de colección ($P<0,01$), observándose aumentos significativos a favor de la CC en los meses de noviembre ($P=0,0003$), diciembre ($P=0,0005$), enero ($P=0,0003$), febrero ($P=0,04$), abril ($P<0,0001$), mayo ($P=0,04$), junio ($P=0,001$) y septiembre ($P=0,009$).

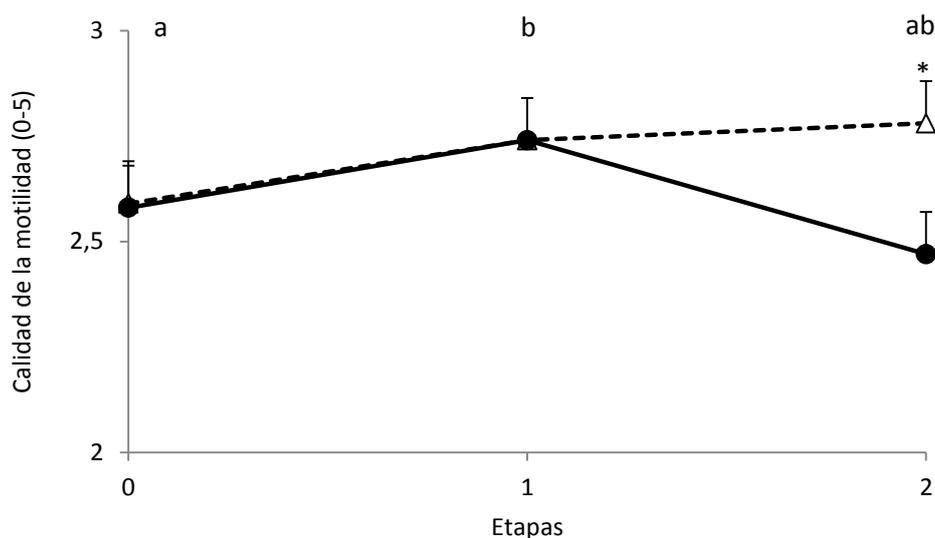


Figura 9. Calidad de la motilidad de espermatozoides previo al proceso de congelación/descongelación de muestras diluidas con TCG-yema huevo-sucrosa (técnica ultrarrápida, ●) y con TCG-yema de huevo-sucrosa (técnica clásica, -Δ-) de chivos de Gabón a lo largo de etapas (0: semen fresco; 1: semen purificado; 2: semen con diluyente de CC/CU). Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, para etapa se promediaron todos los meses de colección. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de las etapas ($P<0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y las etapas se indican como: * ($P<0,05$).

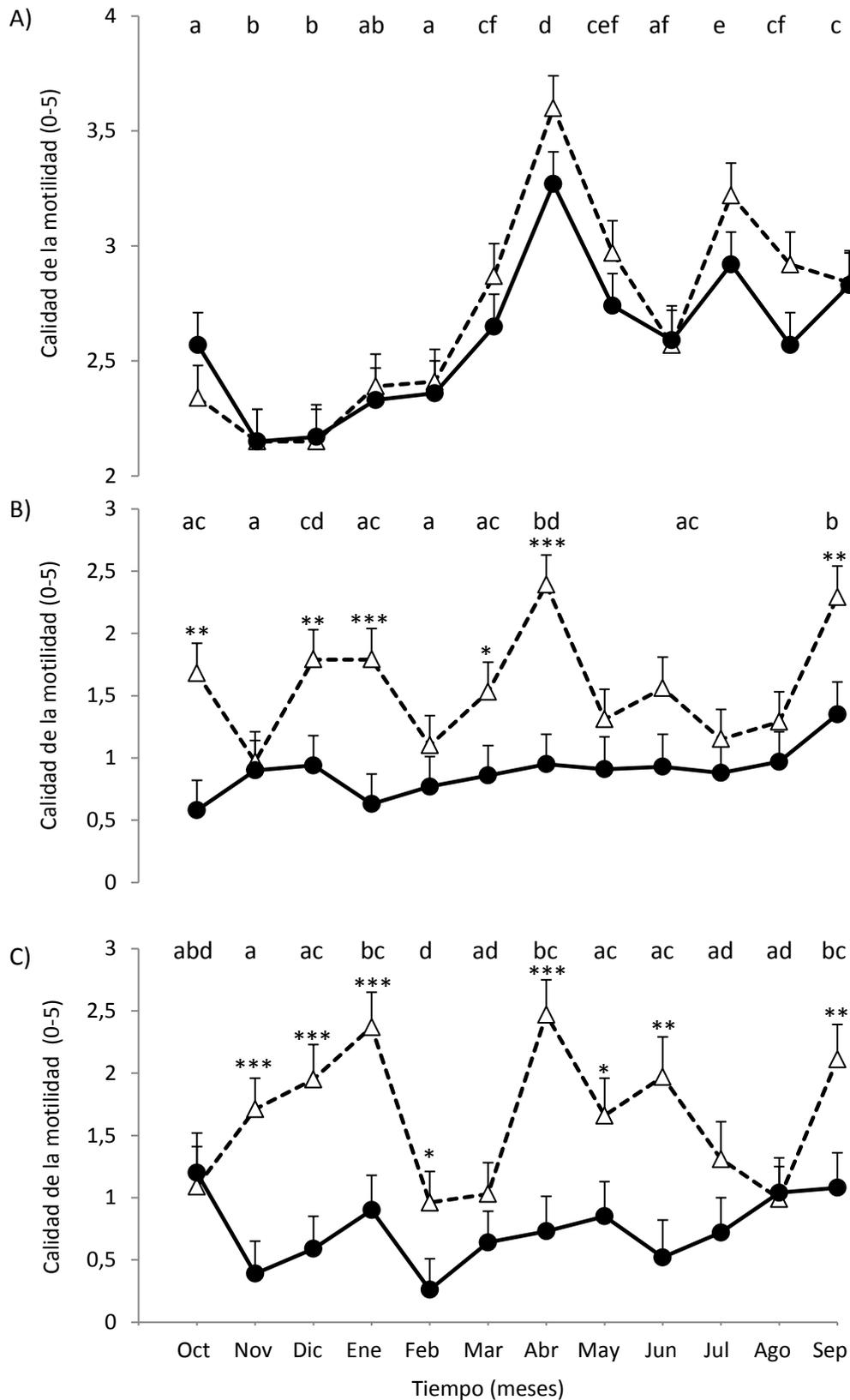


Figura 10. Calidad de la motilidad de espermatozoides criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU, C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$).

5.2.4. *Porcentaje de espermatozoides con membrana funcional*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 11A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$) pero no existió diferencias entre las técnicas. Además se presentó una interacción entre los técnicas, el tiempo y las diferentes etapas ($P < 0,001$). Sin embargo no se encontraron interacciones entre los tratamientos y el tiempo, ni entre las técnicas y las diferentes etapas.

En la etapa de semen DC/DU, el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional se preservó mejor con la técnica de CC que con la de CU ($41,8 \pm 2,4$ vs $27,8 \pm 2,4$; $P = 0,0007$). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional varió a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 11B). Además existió una interacción entre los técnicas empleadas y los meses de colección ($P < 0,0001$). Los meses en los que se presentó dicha interacción a favor de la CC son diciembre ($P < 0,0001$), enero ($P < 0,0001$), febrero ($P < 0,0001$), marzo ($P = 0,003$) y septiembre ($P = 0,04$).

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor en aquellos espermatozoides preservados mediante la técnica de CC en comparación a los CU ($45,71 \pm 1,06$ vs $23,90 \pm 1,07$; $P < 0,0001$). Además se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 11C) y se observó una interacción entre los técnicas y los meses de colecta ($P < 0,0001$). Las interacciones se observaron en los meses de octubre ($P < 0,0001$), noviembre ($P < 0,0001$), diciembre ($P < 0,0001$), enero ($P < 0,0001$), febrero ($P < 0,0001$), marzo ($P = 0,0006$), junio ($P < 0,0001$), agosto ($P = 0,0002$) y septiembre ($P < 0,0001$).

5.2.5. *Porcentaje de espermatozoides vivos*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 12A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$) pero no se encontraron diferencias entre las técnicas empleadas. Además se presentó una interacción entre los técnicas, el tiempo y las diferentes etapas ($P = 0,02$). Sin embargo no se presentaron interacciones entre las técnicas y el tiempo, ni entre las técnicas y las diferentes etapas.

En la etapa de semen DC/DU el porcentaje de espermatozoides vivos presentó diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 12B). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre las técnicas. Además se presentó una interacción entre las técnicas y los meses de colecta ($P = 0,0001$), la misma se observó durante los meses de octubre ($P = 0,008$) y enero ($P = 0,004$).

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente el porcentaje de espermatozoides vivos presentó diferencias a lo largo de los meses de colecta ($P = 0,001$; Figura 12C). Además existió una interacción entre las técnicas y los meses de colecta ($P < 0,0001$), a favor de la CC durante octubre ($P = 0,0001$), noviembre ($P = 0,003$), diciembre ($P = 0,0002$) y enero ($P = 0,0001$). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre las técnicas.

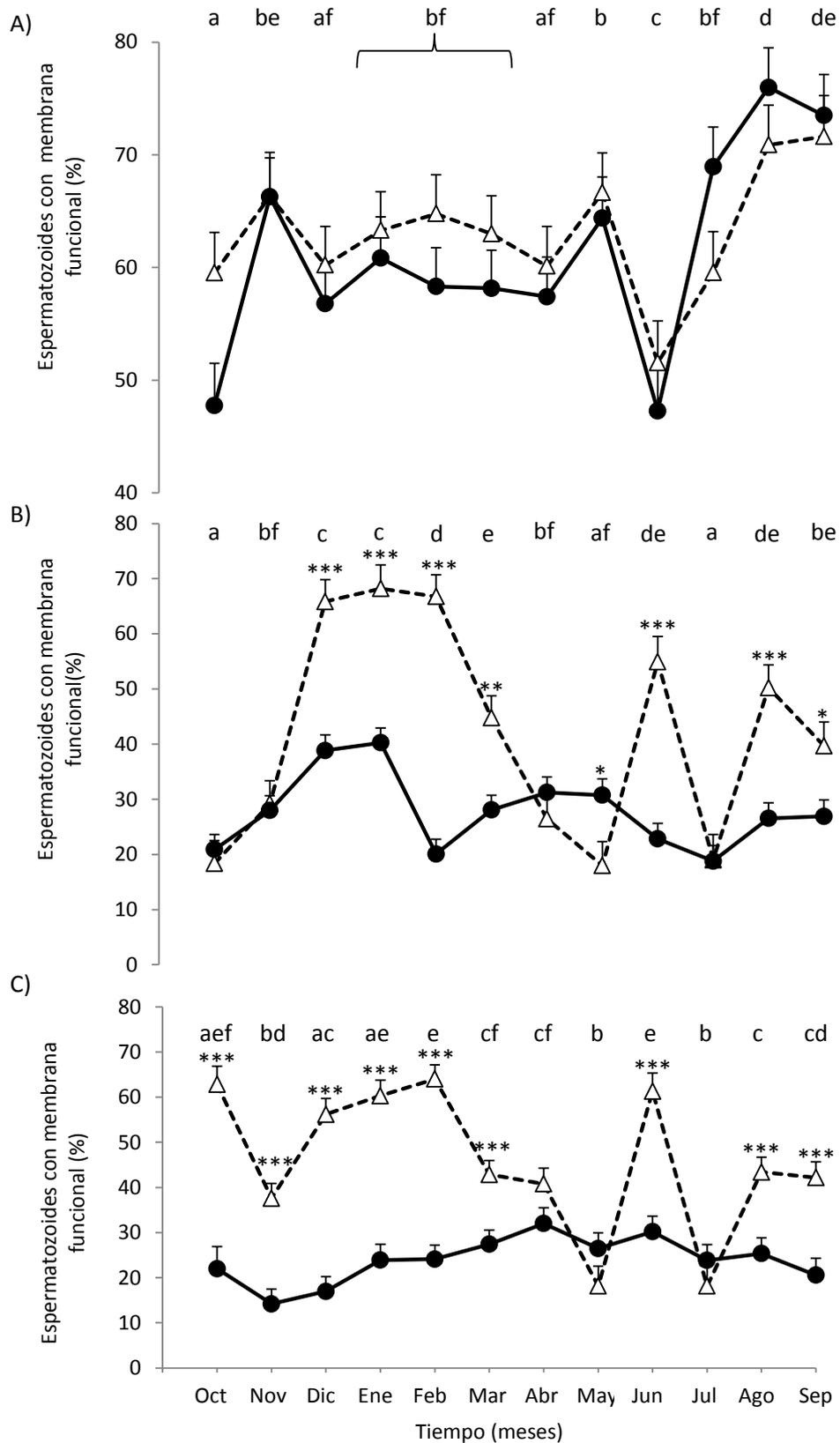


Figura 11. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DC. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados \pm EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), y *** ($P < 0,001$).

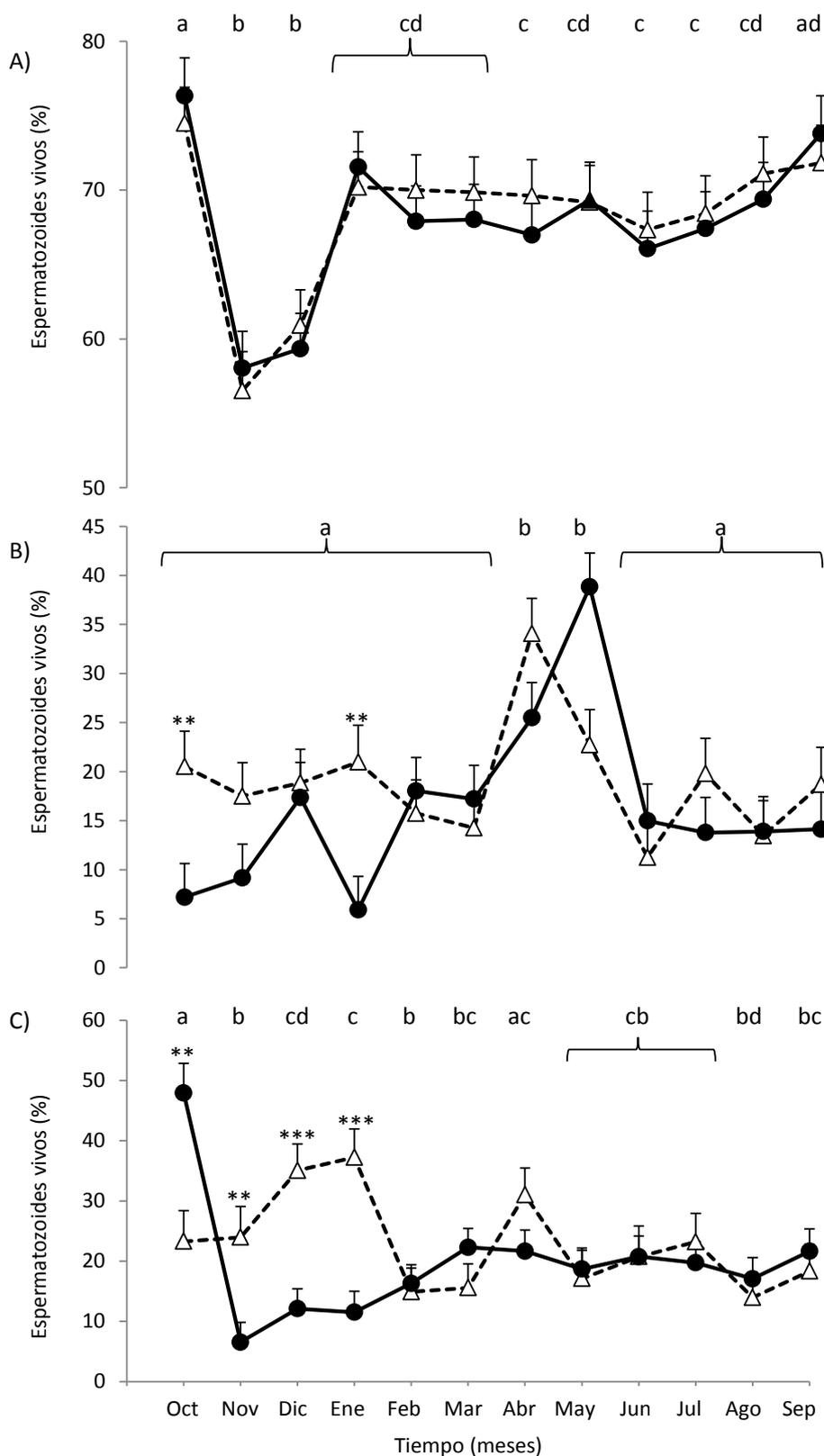


Figura 12. Porcentaje de espermatozoides vivos criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-△-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), y *** ($P < 0,001$).

5.2.6. *Porcentaje de espermatozoides normales*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 13A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$), no presentándose diferencias entre las técnicas. Además se presentó una interacción entre las técnicas, el tiempo y las diferentes etapas ($P < 0,0001$). Sin embargo no se encontraron interacciones entre las técnicas y el tiempo, ni entre las técnicas y las diferentes etapas.

En la etapa de semen DC/DU el porcentaje de espermatozoides normales presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$, Figura 13B). Sin embargo, no hubo diferencias entre las técnicas. Además se presentó una interacción entre las técnicas, el tiempo y los meses de colecta ($P = 0,03$).

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente, el porcentaje de espermatozoides vivos presentó diferencias a lo largo de los meses de colecta ($P < 0,0001$; Figura 13C). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las técnicas utilizadas. Además se presentó una interacción entre las técnicas y los meses de colecta ($P = 0,002$) durante octubre ($P = 0,02$), mayo ($P = 0,01$) y junio ($P = 0,03$).

5.2.7. *Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro fue mayor con la técnica de CC que con el método de CU ($83,3 \pm 0,7$ vs $78,2 \pm 0,7$; $P < 0,0001$). Además este parámetro varió a lo largo de los meses de colección ($P = 0,005$; Figura 14A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$). Hubo una interacción entre las técnicas empleadas y las etapas ($P < 0,0001$): el porcentaje de espermatozoides móviles fue mayor mediante la técnica de CC en comparación a la CU en la etapa de purificación luego de la DC/DU ($P < 0,0001$). También existió interacción entre las técnicas, el tiempo y las etapas ($P = 0,0001$). Sin embargo no hubo interacción entre las técnicas y los meses de colección.

En la etapa de semen DC/DU el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro fue mejor mediante la técnica de CC que con la CU ($67,1 \pm 4,2$ vs $53,6 \pm 4,2$; $P = 0,03$). Además se observaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P = 0,0002$; Figura 14B). Sin embargo no existió interacción entre las técnicas utilizadas y los meses de colección.

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro fue mayor mediante la técnica de CC que con la de CU ($63,6 \pm 0,7$ vs $59,9 \pm 0,7$; $P = 0,001$). Además se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,0001$; Figura 14C), pero no existió una interacción entre las técnicas y los meses de colección.

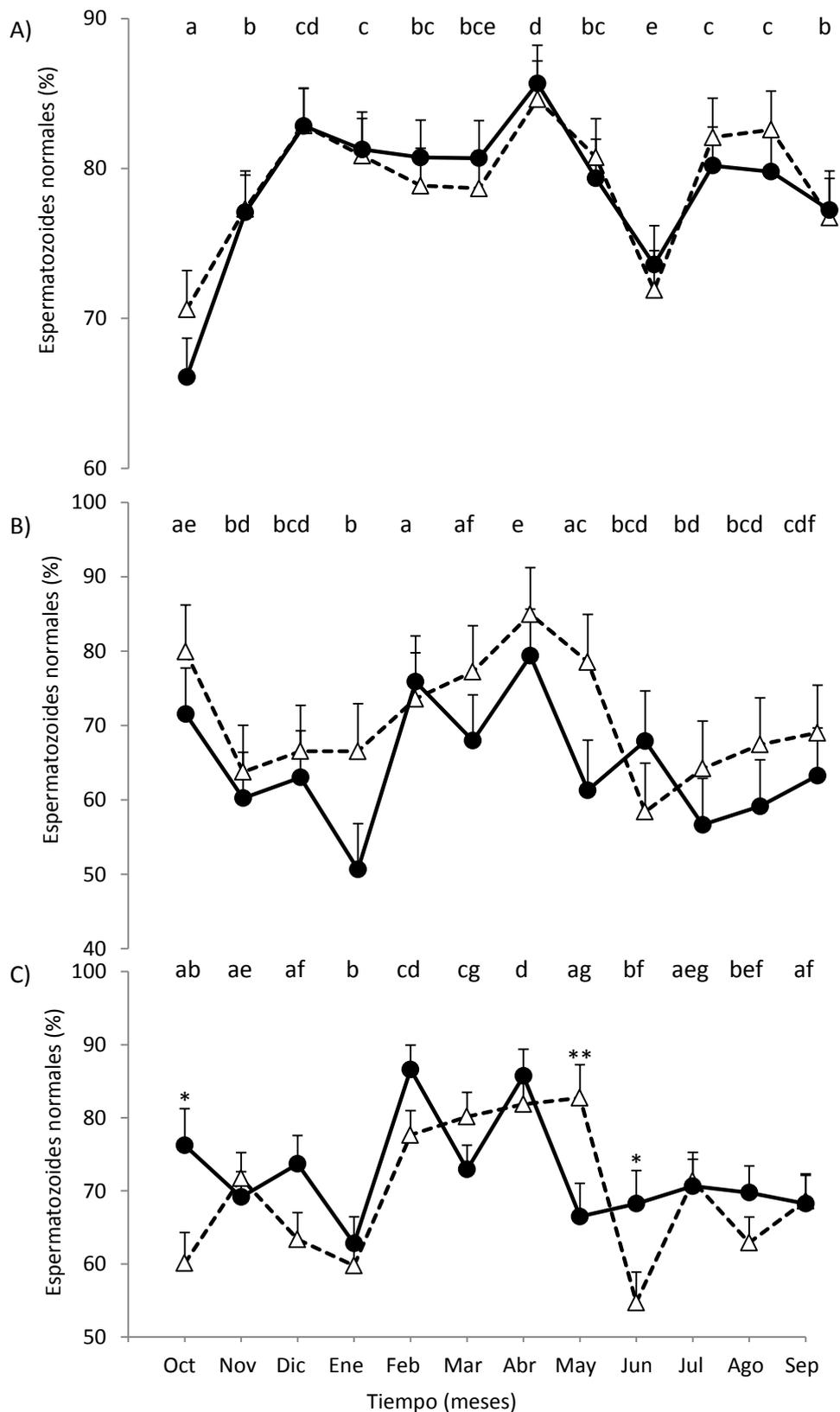


Figura 13. Porcentaje de espermatozoides normales criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P < 0,05$). Diferencias significativas en la interacción de la técnica y los meses de colección se indican como: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$).

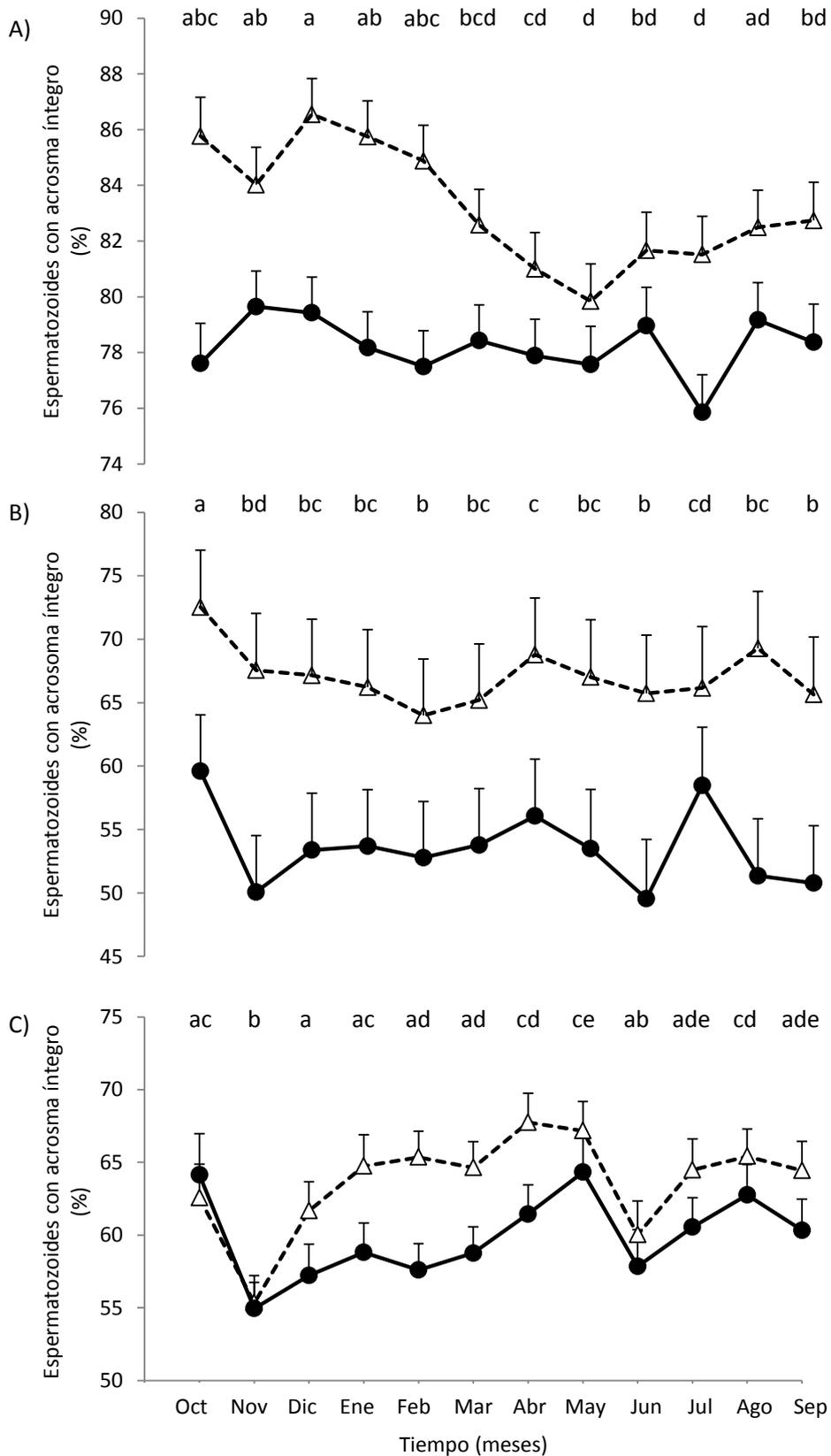


Figura 14. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección (P<0,05).

5.2.8. *Porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue mayor mediante la técnica de CU que con la técnica de CC ($13,71 \pm 0,84$ vs $10,5 \pm 0,84$; $P < 0,0001$). Se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P = 0,04$; Figura 15A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$). Además, existió una interacción entre las técnicas y las etapas ($P < 0,0001$): el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue mayor mediante la técnica de CU en comparación a la CC en la etapa de purificación luego de la DC/DU ($P < 0,0001$). También hubo una interacción entre las técnicas, el tiempo y las etapas ($P = 0,0004$).

En la etapa de semen DC/DU, el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma dañado no presentó diferencias significativas a lo largo de los meses de colección, ni interacciones entre las técnicas, o entre las técnicas y los meses de colecta.

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue mayor mediante el método de CU en comparación a la CC ($23,1 \pm 0,6$ vs $21,2 \pm 0,6$; $P = 0,04$). Además se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P = 0,001$; Figura 15B), pero no existió interacción entre las técnicas y los meses de colección.

5.2.9. *Porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido*

Al evaluar el semen previo a la criopreservación, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido fue mejor mediante la técnica de CU en comparación a la CC ($8,0 \pm 0,5$ vs $6,23 \pm 0,5$; $P = 0,01$). Se presentaron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección ($P = 0,02$; Figura 16A) y de las diferentes etapas ($P < 0,0001$). Además existió una interacción entre las técnicas y las distintas etapas ($P < 0,0001$): el porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido fue mayor mediante la técnica de CU en comparación a la CC en la etapa de purificación luego de la DC/DU ($P < 0,0001$). Sin embargo no hubo interacción entre las técnicas y el tiempo, ni entre las técnicas, el tiempo y las etapas.

En la etapa de semen DC/DU, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido presentó diferencias significativas a lo largo de los distintos meses de colección ($P = 0,005$; Figura 16B). No existieron diferencias significativas entre las técnicas ni interacción entre los tratamientos y el tiempo.

En la etapa de semen purificado una vez añadido el correspondiente diluyente, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido fue mejor mediante la técnica de DU en comparación a la DC ($17,2 \pm 0,4$ vs $15,5 \pm 0,4$; $P = 0,004$; Figura 16C). Sin embargo, no existieron diferencias significativas a lo largo de los meses de colección, ni interacción entre las técnicas y el tiempo.

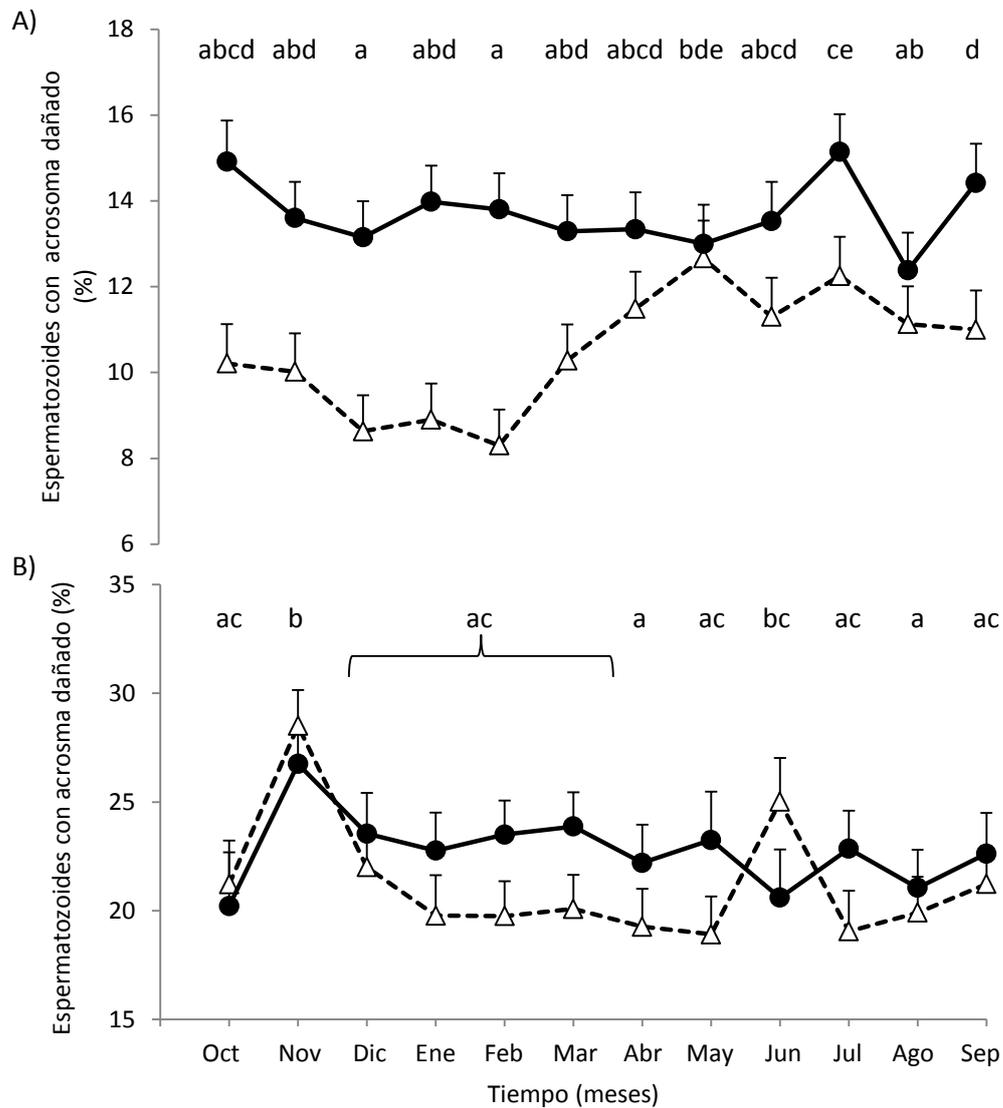


Figura 15. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección (P<0,05).

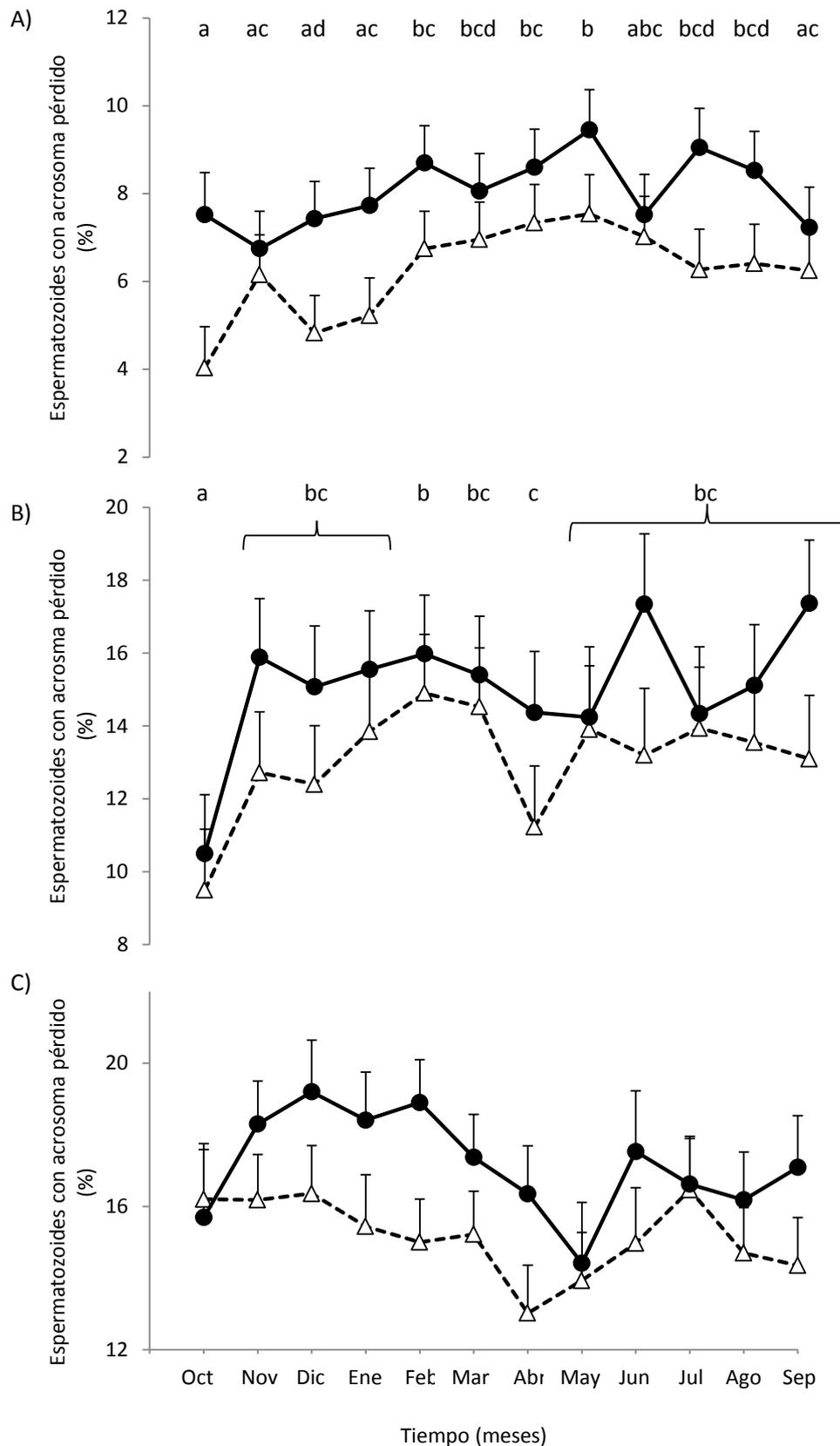


Figura 16. Porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido criopreservados mediante la técnica de congelación ultrarrápida (-●-) y de congelación clásica (-Δ-) de chivos de Gabón, a lo largo de los meses de colección. A) semen fresco, purificado y una vez añadido el diluyente (CC/CU), B) semen luego de DC/DU y C) semen purificado luego de ser DC/DU. Las muestras fueron colectadas quincenalmente durante 12 meses, realizándose una media de cada mes. Los datos se presentan como media de los mínimos cuadrados ± EEM de la muestra de semen luego de DC/DU. Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo de los meses de colección (P<0,05).

6. DISCUSIÓN

La CC permitió obtener mejores resultados en los parámetros seminales analizados que la CU. La CU es una técnica de criopreservación actualmente en desarrollo, por lo que los resultados obtenidos en esta Tesis pueden servir de base para generar nuevas hipótesis (ej: cambios en la composición del diluyente de CU) para mejorarla, considerando que es una metodología más sencilla de aplicar para la criopreservación espermática. La viabilidad de empleo de esta técnica como procedimiento alternativo sencillo y barato, ha sido demostrada en el macho montés (*Capra pyrenaica*), en donde se ha podido obtener nacimientos tras la inseminación artificial con células espermáticas eyaculadas, aunque con tasas de fertilidad inferiores que con espermatozoides criopreservados por métodos convencionales (Pradiee *et al.*, 2015). En espermatozoides epididimarios de macho montés criopreservados por CU, la capacidad de fertilización mediante FIV heteróloga es similar que en espermatozoides epididimarios criopreservados por CC (Pradiee *et al.*, 2018). En algunas especies, como la gacela dama (*Gazella dama*), oso pardo (*Ursus arctos*), o jirafa (*Giraffa camelopardalis*), la tasa de criosupervivencia y de actividad cinética de espermatozoides criopreservados por CU son similares, e incluso superiores, que con CC (Santiago-Moreno *et al.*, 2018). En contrapartida, en otras especies los resultados de criosupervivencia son inferiores a los de CC (ej: espermatozoides eyaculados de muflón) (Pradiee *et al.*, 2017), o incluso extremadamente bajos (Santiago-Moreno *et al.*, 2018). Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de la técnica de CU como método alternativo de criopreservación, así como la importancia del componente genético en la respuesta del semen a los procesos de congelación/descongelación.

Los resultados muestran que la propia dilución con el diluyente para CU (TCG-yema de huevo-sucrosa) determina una disminución de la motilidad espermática previa a la CU propiamente dicha. Este efecto también ha sido previamente observado con la utilización de otros disacáridos como aditivos en los diluyentes (ej: lactosa); se ha apuntado como causas una posible interferencia de los disacáridos con la integración de otros azúcares al medio intracelular afectando, por tanto, al metabolismo energético de los espermatozoides (Santiago-Moreno *et al.*, 2007).

En este trabajo se obtuvieron mejores resultados mediante la CC en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro previo a su congelación. Luego de DC se obtuvieron mejores resultados en la calidad de la motilidad, los porcentajes de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, con membrana funcional y con acrosoma íntegro, que con la DU. Además, se obtuvieron mejores resultados en la purificación luego de la DC en comparación a la DU en estos mismos parámetros. Los procesos bioquímicos y físicos que ocurren durante las etapas de las técnicas de criopreservación empleadas podrían ser una explicación para estas diferencias. En la CU se busca evitar la formación de cristales de hielo intracitoplasmáticos ya que estos inducen daño y pérdida de la función celular, lo que constituye el principal obstáculo que presenta la CC. El crioprotector utilizado para la congelación clásica fue el glicerol, cuyo bajo peso molecular permite que ingrese a la célula y desplace el agua intracelular (Ishibashi *et al.*, 1997). El ingreso de agua sumado a un proceso de congelación lento reduce la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000). Sin embargo, en estudios recientes realizados en el INIA (Madrid, España) se ha demostrado que con la técnica de CU se forman cristales de hielo en el medio

extracelular, lo que afecta la eficiencia del proceso (Bóveda *et al.*, 2018a). La formación de cristales de hielo en el medio extracelular afecta en forma directa la membrana de los espermatozoides (Parks y Graham, 1992). En coincidencia, en los resultados obtenidos a partir de la técnica de HOST se observó que con la técnica de CU se afectó la membrana de una mayor cantidad de espermatozoides que con la CC. Este resultado coincide con lo reportado por Amann y Pickett (1987), quienes afirman que a velocidades de enfriamiento rápidas se induce daño y muerte celular. A pesar de ello, no hubo diferencias significativas entre las técnicas en el porcentaje de espermatozoides vivos, lo que coincide con lo reportado por Bóveda *et al.* (2018b), quienes compararon la congelación clásica de semen epididimario con la congelación ultrarrápida en dos especies de rumiantes salvajes, *Ovis musimon* (muflón) y *Dama dama* (gamo común). Sin embargo es necesario considerar que la colecta de semen epididimario es un procedimiento *postmortem*, en que se colectan espermatozoides que presentan cierto grado de inmadurez, caracterizándose por la presencia de un alto número de gotas citoplasmáticas y por una baja motilidad (Braun *et al.*, 1994). Sin embargo, la diferencia obtenida en los resultados de porcentaje de espermatozoides con membrana funcional y espermatozoides vivos se debería a la misma razón, ya que la membrana de la cola y la membrana de la cabeza del espermatozoide funcionan independientemente, por lo que el enrollamiento de la cola no sería una indicación directa de la actividad de la membrana de la cabeza (Jeyendran *et al.*, 1984). Como se mencionaba anteriormente, el daño producido por la formación de cristales de hielo extracelulares sería una de las principales causas de una reducción en la funcionalidad de la membrana espermática.

La única variable que presentó diferencias significativas a favor de la CC en todos los análisis realizados fue el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro. El shock térmico generado durante cualquier proceso de criopreservación produce lesiones irreversibles a los espermatozoides, generando la desorganización de los lípidos de la membrana plasmática del mismo (Drobnis *et al.*, 1993), lo que activa la reacción acrosómica (Cross, 1996). Sin duda la velocidad de congelación y la composición de los diluyentes son factores determinantes del grado de desestabilización de la membrana celular (Anchordoguy *et al.*, 1987). Sin embargo, de acuerdo a experimentos realizados por Anchordoguy *et al.* (1987), tanto la sucrosa como el glicerol interactúan con los lípidos de la membrana, pero la sucrosa no afectaría tanto a la membrana plasmática como lo hace el glicerol. Isachenko *et al.* (2008) concluyeron que la CU con crioprotectores como sucrosa son capaces de criopreservar correctamente las células sin afectar parámetros fisiológicos relevantes. Por tanto, el daño acrosomal está probablemente más asociado al shock térmico que al shock osmótico del diluyente empleado. Esto va acompañado de los recientes indicios que confirman la formación de cristales de hielo en el medio extracelular durante la CU, y que explicarían el aumento de espermatozoides con acrosoma dañado o perdido.

La motilidad espermática se afectó mayormente durante la DU y la purificación. Por un lado, el shock de frío afecta la membrana celular y esto también afecta la motilidad espermática (Henry *et al.*, 1993). La motilidad de los espermatozoides depende de funciones bioquímicas, como el metabolismo y la acción microtubular de las fibras de la cola (Jeyendran *et al.*, 1984). Según O'Connell *et al.* (2002) la reducción en la motilidad espermática luego de un proceso de congelación, puede explicarse por un deterioro en la actividad mitocondrial. En el mismo trabajo, O'Connell *et al.* (2002) observaron una disminución en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y una consecuente reducción en la función mitocondrial, mostrando la

estrecha relación entre estos parámetros. Esto podría estar explicando el resultado obtenido en este trabajo, donde se observó un claro efecto de la técnica de congelación en el porcentaje de espermatozoides móviles. El tiempo de congelación/ descongelación también es relevante en la disminución de la motilidad espermática y es un factor que también lleva a afectar otros parámetros seminales como la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional y el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro, como ocurrió en este trabajo.

Si bien se demostró que un tiempo de equilibrado de 30 min a 5 °C para la congelación ultrarrápida proporciona resultados óptimos de criopreservación (Pradiee *et al.*, 2015), en este trabajo se obtuvieron mejores resultados con la DC en las etapas de DC y DU. Existen trabajos que demuestran que el enfriamiento rápido de espermatozoides humanos (Morris, 2006) y de caballos (Morris *et al.*, 2007) conduce a una pérdida de viabilidad, pero que esta no sería a causa de la formación de hielo intracelular. Morris *et al.* (2012) demostraron que a tasas de enfriamiento rápidas, el daño celular causado a los espermatozoides es el resultado de un desequilibrio osmótico durante la etapa de DU. Este grupo de trabajo realizó análisis ultraestructurales que determinaron una re-cristalización alrededor de la célula, lo que podría estar causando un daño en la membrana celular. Afirmaron que el daño celular estaría sucediendo por un alto contenido de proteínas intracelulares y por el desequilibrio osmótico que se produce a velocidades de congelación ultrarrápidas, generándose una cristalización que va a estar limitada por la difusión del volumen extracelular. Por esta razón se puede relacionar el corto tiempo empleado durante la DU con la disminución de los parámetros seminales anteriormente mencionados.

No hubo diferencias en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal de acuerdo a la técnica utilizada. Sin embargo, los procesos de criopreservación afectan la morfología espermática (Hammadeh *et al.*, 1999; O'Connell *et al.*, 2002; Ozkavukcu *et al.*, 2008), razón por la que se observó una disminución del porcentaje de espermatozoides normales a lo largo de las etapas independientemente de la técnica. Estos cambios ocurren debido a que los cambios en la osmolaridad del medio durante los procesos de congelado y descongelado generan una deformación de la membrana celular. Además, cambios de este tipo pueden potenciar el plegamiento de la cola espermática (Ozkavukcu *et al.*, 2008) y la presencia de cabezas sueltas podrían deberse a la formación de cristales de hielo extracelulares. Ozkavucu *et al.* (2008) afirmaron que lo más afectado es el acrosoma debido a que es una estructura muy frágil, lo que coincide con lo reportado en esta Tesis.

En cuanto a los resultados obtenidos al purificar las muestras DC/DU, también se vio un efecto a favor de la técnica de CC. Debe recordarse que la mayoría de estos espermatozoides tienen lesiones causadas por el propio proceso de CC/CU que se llevó previamente a cabo. A esto se le suma el daño causado por la temperatura de la DC/DU, y por último el daño que se genera al purificar, ya que los espermatozoides son sometidos a una centrifugación durante 20 min a 300 G. Según Urrego *et al.*, (2008), la centrifugación de los espermatozoides durante 10, 30 o 45 min a 700 G tiene efecto deletéreo sobre los espermatozoides, y la centrifugación durante 45 min además genera una pérdida de la integridad funcional de la membrana. Si bien en este trabajo se utilizó una velocidad de centrifugación menor, se constataron daños a nivel de la integridad acrosómica lo que podría explicar en parte esta disminución. El daño generado por la centrifugación, sumado a lo ya mencionado respecto a otros factores, como composición del

diluyente y formación de cristales de hielo en el medio celular, también colaboran al daño acrosomal.

En este trabajo se observó un aumento de los niveles de testosterona durante los meses de abril y mayo. Dichos resultados coinciden con los registrados por Giriboni *et al.* (2017), quien reportó que esta raza de chivos presenta una estacionalidad poco marcada. Esto coincide también con los datos de semen fresco, ya que sólo se observaron diferencias a lo largo del tiempo en el volumen, la motilidad de masa y la calidad de la motilidad. Durante los meses de mayo, junio y julio se produjo un aumento del volumen del eyaculado. A su vez la calidad de la motilidad de los espermatozoides aumentó en los meses de marzo, abril y mayo, lo que coincide con el aumento de testosterona observado. Sin embargo, la motilidad de masa disminuyó durante este período. Esto último puede deberse a que la motilidad en masa está relacionada a la concentración espermática y a la calidad de la motilidad, ya que corresponde al movimiento colectivo de los espermatozoides. Si bien, no existieron diferencias significativas de la concentración espermática a lo largo del año, la misma disminuyó en julio en coincidencia con que en este momento se observara la menor motilidad espermática en masa del año. Sin embargo, la calidad de la motilidad está relativamente alta durante ese mes, por lo que la motilidad en masa parecería estar influenciada por los dos parámetros anteriormente mencionados. El resto de los parámetros seminales evaluados no presentaron diferencias significativas a lo largo del año, reafirmando que la estacionalidad de los chivos de Gabón en nuestro país es poco marcada.

Los resultados demuestran que los momentos de CU-DU son sumamente críticos para la supervivencia celular. Las diferencias a lo largo de los meses de colección podrían estar en parte relacionadas a las variaciones de testosterona. Las concentraciones altas de testosterona en los procesos de CC-DC aumentan los procesos deletéreos que acontecen durante estas etapas (Coloma *et al.*, 2010b), por lo que se podría explicar la variación en parámetros seminales como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro a lo largo de los meses. También se sabe que variaciones en la concentración de testosterona pueden afectar el metabolismo espermático, el potencial de membrana (Calzada *et al.*, 1988) y el transporte de nutrientes a través de la membrana (Ballesteros *et al.*, 1983), afectando de esta forma las propiedades de la membrana espermática (Purohit *et al.*, 2000), y por tanto su crioresistencia. En otras variables espermáticas, como el porcentaje de espermatozoides móviles, con motilidad progresiva y la calidad de la motilidad, la asociación entre el patrón de secreción de testosterona y la respuesta a los procesos de congelación/descongelación no es tan manifiesta. Estas variables mejoraron en el mes de septiembre (equinoccio de primavera) cuando los niveles de testosterona ya se encontraban basales desde julio, poniendo de relieve el posible papel de otros factores y hormonas dependientes de los cambios del fotoperiodo (ej. prolactina, hormonas tiroideas) que deberían ser estudiados. La prolactina es una hormona proteica que es secretada por dos fuentes en el tracto reproductivo, el epidídimo y la vesícula seminal (Rui *et al.*, 1985), y que actúa sobre las células de Leydig, los espermatozoides y las espermátidas, y tiene un papel regulador en la esteroidogénesis y en la espermatogénesis (Jabbour y Lincoln, 1999). Pujinato *et al.* (2010) reportaron la existencia de receptores de prolactina en el propio espermatozoide maduro, en lo que es la región postacrosomal de la cabeza, en el cuello, en la pieza media y en la pieza principal de la cola. La prolactina puede afectar el transporte de sodio y potasio entre los espermatozoides y el plasma seminal, afectando así la motilidad de los mismos (Shet *et al.*, 1975). En función a lo mencionado,

se podría inferir que la testosterona y la prolactina podrían estar influyendo ciertos parámetros seminales a la hora de la congelación/descongelación.

7. CONCLUSIONES

- La congelación clásica fue más efectiva que la congelación ultrarrápida para criopreservar semen de chivos de Gabón a lo largo del año, para nuestras condiciones experimentales.
- Independientemente de la calidad inicial del eyaculado, se apreciaron cambios estacionales en la respuesta espermática a los procesos de congelación/descongelación que podrían no estar del todo asociados a los cambios anuales de secreción de testosterona.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aboagla, E.M.E., Terada, T., 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 1160-1172.
- Akcay, E., Reilas, T., Andersson, M., Katila, T., 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53: 481-485.
- Amann, R.P., Pickett, B. W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 7: 145-173.
- Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24: 324-331.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H., 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and cellular endocrinology*, 187: 77-81.
- Arendt, J., 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of reproduction*, 3: 13-22.
- Arroyo, J., 2011. Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14: 829-845.
- Bajo, J.M., Coroleu, B., 2009. *Fundamentos de Reproducción*. Editorial Médica Panamericana, 408 p.
- Ballesteros, L.M., Delgado, N.M., Rosado, A., Hernandez, O., 1983. Effect of steroid hormones on membrane sugar transport in human spermatozoa. *Archives of andrology*, 11: 95-100.
- Boiso, I., 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18: 127-131.
- Bouligand, J., Ghervan, C., Tello, J.A., Brailly-Tabard, S., Salenave, S., Chanson, P., Lombés, M., Millar, R.P., Guiochon-Mantel, A., Young, J., 2009. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *New England Journal of Medicine*, 360: 2742-2748.
- Bóveda P, A Toledano-Díaz, C Castaño, MC Esteso, A López-Sebastián, D Rizos, R Ungerfeld, J Santiago-Moreno. 2018a. Cryo-scanning and conventional electron microscopy of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sperm cryopreserved using slow and ultra-rapid cooling protocols. 22nd Annual ESDAR Conference 2018 Cordoba, Spain.
- Bóveda, P., Esteso, M.C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Muñiz, A., Prieto, P., Mejía, O., Ungerfeld, R., Santiago-Moreno, J., 2018b. Slow and ultra-rapid freezing protocols for

cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*) epididymal sperm. *Animal reproduction science*, 192: 193-199.

Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N., 1994. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology*, 41: 809-818.

Bronson, F.H., 1989. *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press, Chicago, 324 pp.

Calzada, L., Bernal, A., Loustaunau, E., 1988. Effect of steroid hormones and capacitation on membrane potential of human spermatozoa. *Archives of andrology*, 21: 121-128.

Clarke, I.J., Cummins, J.T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111: 1737-1739.

Coloma M.A, Toledano-Diaz A, Lopez-Sebastian A, Santiago-Moreno J. 2010a. The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology* 73, 900–908.

Coloma, M.A., Gómez-Brunet, A., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., Santiago-Moreno, J., 2010b. Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. *Cryobiology*, 61: 204-210.

Criste, F.L., 2011. Basic aspects of semen cryopreservation and evaluation. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 68: 1-2.

Cross, N.L., 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of reproduction*, 54: 138-145.

Dacheux, J.L., Pisselet, C., Blanc, M.R., Hochereau-de-Reviere, M.T., Courrot, M., 1981. Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 363-371.

Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reproduction Nutrition Development*, 44: 183-193.

Dias, J.C.O., Veloso, C.M., Santos, M.C.D.R.S., Silveira, C.O., Iglesias, E., Furtado, P.H., de Oliveira Donzele, R.F.M., 2018. Seasonal variations in the seminal plasma composition of male goats. *Multi-Science Journal*, 1: 34-40.

- Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchozdoguy, T.J., Overstreet, J.W., Crowe, J.H., 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 265: 432-437.
- Dufour, J.J., Fahmy, M.H., Minvielle, F., 1984. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *Journal of Animal Science*, 58: 416-422.
- Dziekońska, A., Kinder, M., Fraser, L., Strzeżek, J., Kordan, W., 2017. Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. *Journal of Veterinary Research*, 61: 127-133.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza. Acriba, 192p.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.
- Fernández, S., Sestelo, A., Rivolta, M., Córdoba, M., 2013. Capacitation and acrosome reaction induction on thawed *Dama dama* deer spermatozoa: glycine effect as cryopreservation diluent supplement. *Zoological science*, 30: 1110-1116.
- Gao, D.Y., Ashworth, E., Watson, P.F., Kleinhans, F.W., Mazur, P., Critser, J.K., 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of reproduction*, 49: 112-123.
- Gao, D., Critser, J.K., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Institute for Animal Research Journal*, 41: 187-196.
- Garcia, J., Vila, L., 1984. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica*. 6: 219-225.
- Giriboni, J., 2014. Estímulo con hembras en celo y estacionalidad reproductiva de chivos adultos de Gabón. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Biología. Montevideo, Uruguay.
- Giriboni, J., Lacuesta, L. and Ungerfeld, R., 2017. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology*, 87: 284-289.
- Graham, J.K., Foote, R.H., 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24: 42-52.

Griswold, M.D., McLean, D., 2006. The Sertoli Cell. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3a Edición. Missouri. Elsevier Academic Press, 949–976 pp.

Goeritz, F., Quest, M., Wagener, A., Fassbender, M., Broich, A., Hildebrandt, T.B., Hofmann, R.P., 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.

Gómez, M.D., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M, Reguero, M.T., 2006. Fundamentos de la Criopreservación Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57: 291-300.

Hafez, E.S., 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science*, 42: 189-231.

Hammadeh, M.E., Askari, A.S., Georg, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W., 1999. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *International journal of andrology*, 22: 155-162.

Hammoudi, S.M., Ait-Amrane, A., Belhamiti, T.B., Khiati, B., Niar, A., Guetarni, D., 2010. Seasonal variations of sexual activity of local bucks in western Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 9: 362-368.

Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N.J., Handelsman, D.J., Allan, C.M., 2003. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*, 144: 509-517.

Hedger, M.P., Hales, D.B., 2006. Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3° Ed, Missouri, Elsevier Academic Press. 1195-1286 pp.

Hellgren, E.C., Lochmiller, R.L., Amoss, M.S., Seager, S.W.J., Magyar, S.J., Coscarelli, K.P., Grant, W.E., 1989. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurements and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 85: 677-686.

Henry, M.A., Noiles, E.E., Gao, D., Mazur, P., Critser, J.K., 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and sterility*, 60: 911-918.

Huyen, V. T., Trang, N. T., Anh, L. T. L., Giang, V. T., Mai, B. B., Tung, N. X., 2018. The impact of seminal zinc and fructose concentration on human sperm characteristic. *Journal of Maritime Research*, 111: 2.

Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J.M., Kreienberg, R., Katkov, I.I., Schulz, M., Lulat, A.G.I., Risopatrón, M.J., Sanchez, R., 2008. Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*, 136: 167-173.

Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marumo, F., Sasaki, S., 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 20782-20786.

Jabbour, H.N., Lincoln, G.A., 1999. Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localisation, functional activation and the influence of gonadotrophins. *Molecular and cellular endocrinology*, 148: 151-161.

Jeyendran, R., Van der Ven, H., Pérez-Peláez, M., Grabo, B., and Zaneveld, L., 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.

Jobim, M.I.M., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F., Mattos, R.C., 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61: 255-266.

Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T., Herman, H.A., 1953. Lipid and Lipoprotein Constituents of Egg Yolk in the Resistance and Storage of Bull Spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 36: 733-742.

Kayser, J.P., Amann, R.P., Shideler, R.K., Squires, E.L., Jasko, D.J., Pickett, B.W. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 38: 601-614.

Khanum, S.A., Hussain, M., Kausar, R., 2006. Manipulation of estrous cycle in Dwarf goat (*Capra hircus*) using estrumate under different management conditions. *Animal reproduction science*, 92: 97-106.

Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., Dzięcioł, M., 2007. Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted semen analysis system. *Acta Veterinaria Brno*, 76: 601-604.

Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M.M., 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics*, 15: 201.

La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L., Brandelli, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*, 57: 1035-1048.

Langford, G.A., Ainsworth, L., Marcus, G.J., Shrestha, J.N.B., 1987. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *Biology of Reproduction*, 37: 489-499.

- Lambrechts, H., Van Niekerk, F.E., Coetzer, W.A., Cloete, S.W.P., Van der Horst, G., 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*, 52: 1241-1249.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62: 113-141.
- Leivo, S. P., Bradley, L., 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon, C.(Eds) *The male gamete*. McGill University, 46: 502-517.
- Lincoln, G. A., Almeida, O. F., Arendt, J., 1981. Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 30, 23-31.
- Lincoln, G.A., Maeda, K.I., 1992. Reproductive effects of placing microimplants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*, 132:201–15.
- Luyet, B.J., Hodapp, E.L., 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 39: 433-434.
- Malpoux, B., Viguie, C., Skinner, D.C., Thiery, J.C, Chemineau, P., 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*, 44: 431-8.
- Marshall, J.C., Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Paul, S.J., Ortolano, G.A., Kelch, R.P., 1991. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. En: *Proceedings of the 1990 Laurentian Hormone Conference*, 155-189 pp.
- Mason, A.J., Pitts, S.L., Nikolics, K., Szonyi, E., Wilcox, J.N., Seeburg, P.H., Stewart, T.A., 1986. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science*, 234: 1372-1378.
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42: 55-65.
- Menchaca, A., & Ungerfeld, R., 2010. Fisiología reproductiva de la hembra ovina y caprina. *La revista del borrego*, 66p.
- Millar, R.P., 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88: 5-28.
- Morris, G.J., 2006. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21: 2075-2083.
- Morris, G.J., Faszer, K., Green, J.E., Draper, D., Grout, B.W.W., Fonseca, F., 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, 68: 804-812.

Morris, G.J., Acton, E., Murray, B.J., Fonseca, F., 2012. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, 64: 71-80.

Muduuli, D.S., Sanford, L.M., Palmer, W.M. Howland, B.E., 1979. Secretory patterns and circadian and seasonal changes in luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and testosterone in the male pygmy goat. *Journal Animal Science*, 49: 543-553.

Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2004. Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrinology Reviews*, 25: 747–806.

Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals*, 43: 18-31.

Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarous, Y., Baril, G., Leboeuf, B., 1982. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition Développement*, 22, 611-620.

O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S.E.M., 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human reproduction*, 17: 704-709.

Opping, E.N.W., Yebuah, N.M.N., 1981. Some production traits of the West African Dwarf goat. *Tropical animal health and production*, 13: 208-212.

Orth, J., Christensen, A.K., 1977. Localization of 125I-labeled FSH in the testes of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. *Endocrinology*, 101: 262-278.

O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Abel, M.H., 2010. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*, 139: 177-184.

Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., Karahuseyinoglu, S., 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 25: 403-411.

Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.

Pellicer-Rubio, M.T., Combarous, Y., 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112: 95-105.

Pierce, J.G., Parsons, T.F., 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 50: 465-495.

Pradlee, J., Estes, M.C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Santiago-Moreno, J., 2015. Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84: 1513-1522.

Pradlee J, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Lopez-Sebastián A, Guerra R, Santiago-Moreno J., 2017. Conventional slow freezing cryopreserves mouflon spermatozoa better than vitrification. *Andrologia*, 49.

Pradlee J, Sánchez-Calabuig MJ, Castaño C, O'Brien E, Estes MC, Beltrán-Breña P, Maillo V, Santiago-Moreno J, Rizos D., 2018. Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*.

Pujianto, D.A., Curry, B.J., Aitken, R.J., 2009. Prolactin exerts a pro-survival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology*, 151: 1269-1279.

Purohit, S.B., Saxena, D., Laloraya, M., Kumar G.P., 2000. Altered molecular dynamics and antioxidant status in the spermatozoa in testosterone-induced oligospermia in mouse. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 55: 316-325.

Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G., 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of reproduction and fertility*, 60: 403-407.

Rigby, S.L., Brinsko, S.P., Cochran, M., Blanchard, T.L., Love, C.C., Varner, D.D., 2001. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science*, 68: 171-180.

Roy, A., 1957. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179, 318.

Rui, H., Torjesen, P.A., Jacobsen, H., Purvis, K., 1985. Testicular and glandular contributions to the prolactin pool in human semen. *Archives of andrology*, 15: 129-136.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, 62: 77-111.

Santiago-Moreno, J., Gómez-Brunet, A., González-Bulnes, A., Toledano-Díaz, A., Malpoux, B., López-Sebastián, A., 2005. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. *Domestic Animal Endocrinology*, 28: 416-429.

Santiago-Moreno, J., Estesó, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Delgadillo, J. A., López-Sebastián, A., 2017. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science*, 181, 141-150.

Santiago-Moreno J, MC Estesó, A Toledano-Díaz, C Castaño, E. O'Brien, P. Bóveda, E. Martínez-Nevado, A López-Sebastián. 2018. Ultra-rapid cryopreservation of sperm from wild species: an alternative for the cryopreservation in the field. 22nd Annual ESDAR Conference 2018 Cordoba, Spain.

Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Dorado, J., Pulido-Pastor, A., Coloma, M.A., López-Sebastián, A., 2007. Recovery and cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Archives of andrology*, 53: 309-316.

Sarlós, P., Egerszegi, I., Balogh, O., Molnár, A., Cseh, S., Rátky, J., 2013. Sea-sonal changes of scrotal circumference, blood plasma testosterone concentration and semen characteristics in Racka rams. *Small Ruminant Research*, 111: 90-95.

Sheth, A.R., Mugatwala, P.P., Shah, G.V., Rao, S.S., 1975. Occurrence of prolactin in human semen. *Fertility and sterility*, 26: 905-907.

Sias, B., Ferrato, F., Pellicer-Rubio, M.T., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B., Carrière, F., 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1686: 169-180.

Siegel, E.T., Kim, H.G., Nishimoto, H.K., Layman, L.C., 2013. The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. *Reproductive Sciences*, 20: 211-233.

Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A., Stornelli, M.A., 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25.

Strzezek, J., 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reproductive Biology*, 2: 243-266.

Tasseron, F., Amir, D., Schindler, H., 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal of reproduction and fertility*, 51: 461-462.

Thiéry, J.C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M., Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol*, 23: 87-100.

Thurston, L.M., Watson, P.F., 2002. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryoletters*, 23: 255-262.

Tilbrook, A.J. and Clarke, I.J., 2001. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biology of reproduction*, 64: 735-742.

Tittarelli, C.M., 2014. Viabilidad de espermatozoides epididimales caninos y felinos almacenados bajo diferentes condiciones (Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Veterinarias).

Urrego, R., Ríos, A., Olivera Ángel, M., Camargo, O., 2008. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21.

Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Parrilla, I., Gil, M.A., Lucas, X., Roca, J., 2002. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Reproduction in domestic animals*, 37: 369-374.

Watson, P.F., 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 C and deep-freezing. *Journal of thermal biology*, 1: 137-141.