



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CARACTERIZACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

DE VENADO DE CAMPO (*Ozotoceros bezoarticus*)

María Florencia Beracochea González

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

URUGUAY

2014



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

CARACTERIZACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

DE VENADO DE CAMPO (*Ozotoceros bezoarticus*)

María Florencia Beracochea González

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Director de Tesis

Dr. Jorge Gil

Co-Directores de Tesis

Dr. Julián Santiago-Moreno

Co-Directores de Tesis

Dr. José Julián Garde

Co-Directores de Tesis

2014

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Germán Álvaro López; DMV, MS

Departamento de Producción Animal y Pasturas. Facultad de Agronomía

Universidad de la República – Uruguay

Rossana Sapiro; DM, MS, PhD

Departamento de Histología y Embriología. Facultad de Medicina

Universidad de la República - Uruguay

María Isabel Vázquez; DMV, PhD

Departamento de Reproducción Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria

Universidad Nacional de Río Cuarto - Argentina

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

INFORME DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

A mi madre, mi hermano y Euge,
por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Rodolfo Ungerfeld por permitirme transitar por el camino de la investigación, por su paciencia y enseñanza del día a día. Gracias por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en lo que me gusta.

A mis cotutores, Julián Santiago Moreno y Julián Garde por sus aportes en la tesis y en los artículos científicos que se desprendieron de la misma. Especialmente a Jorge Gil no sólo por sus aportes en esta tesis sino por todo lo que me ha enseñado durante este camino.

A Valentina Sitya, por su gran ayuda durante los procesos de criopreservación, descongelación y evaluación de las muestras.

A todos los que participaron en las extracciones en la Reserva ya que su ayuda fue vital para poder criopreservar las muestras: Matías Villagrán, Fernando Fumagalli, Adrián Sestelo, Solana González, Lorena Lacuesta, Julia Giriboni, Marcela Canabal, Laura Morena, Danilo Fila, Juan Pablo Damián, Cesar Savignone, Natalie Citon, Valentina Sitya, Jorge Gil, Rodolfo Ungerfeld, Andrea Álvarez, Alejandro Bielli, Pedro Claudino, Olga García, Alejandro Maroto, Aline Freitas de Melo, Karina Rando, Neftali Clemente.

Al personal de la Reserva involucrado en el trabajo: Edgardo Barrios, Ricardo Sorelo, Jhonny Briosio y Tabaré González.

A la CSIC y a la Intendencia Departamental de Maldonado por financiar el Proyecto “Biología reproductiva del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) 2: biología reproductiva de los machos, extracción, caracterización, manejo y preservación de semen”

A mi familia por estar siempre, especialmente a mi madre y mi hermano por enseñarme a valorar la vida y por acompañarme en este camino.

A Euge por soportarme y ayudarme siempre que fue necesario. Gracias por ser parte de mi vida.

A todos los integrantes del laboratorio en especial a Matías Villagrán, Lorena Lacuesta y Julia Giriboni por ser parte de mí día a día. Gracias por todo lo que me han enseñado.

.

A Xime y Tita, mis amigas del alma, por estar en las buenas y en las malas.

A ese loco grupo de amigos que conocí en el pasaje por la Facultad de Ciencias, especialmente a Valentina Lagos y Sebastián Rodríguez por estar cada vez que los necesite. A todos ellos mil gracias por las charlas, comidas, por su compañía y por estar siempre.

Por último pero no menos importante al tribunal de la Tesis, Isabel Vázquez, Rossana Sapiro y Álvaro López, por aceptar ser parte del tribunal, por la rapidez con la que realizaron la evaluación y por sus aportes y comentarios que permitieron mejorar el contenido de la Tesis.

MUCHAS GRACIAS!

PUBLICACIONES

Hasta el momento los trabajos incluidos en esta tesis han generado la siguiente publicación:

Beracochea, F., Gil, J., Sestelo, A., Garde, J.J., Santiago-Moreno, J., Fumagalli, F., Ungerfeld, R., 2014. Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. Aceptado para su publicación (Anexo 1)

Además se encuentra en una fase avanzada de redacción:

Beracochea, F., Sitya, V., Gil, J., Sestelo, A., Ungerfeld, R., 2014. Cryopreservation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) sperm.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Publicaciones.....	iv
Índice de contenidos.....	v
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	x
Resumen.....	xi
Summary.....	xiii
1. Introducción general.....	1
1.1 Situación actual y distribución del venado de campo.....	1
1.2 Características generales de la especie.....	1
1.3 Estacionalidad reproductiva.....	3
1.4 Parámetros reproductivos del macho de venado de campo.....	4
1.5 Colección de semen.....	4
1.6 Características seminales.....	5
1.6.1 Espermiograma: evaluación subjetiva de la motilidad.....	6
1.6.2 Espermiograma: evaluación objetiva de la motilidad y de la morfometría espermática.....	7
1.6.3 Espermiograma: otros parámetros a ser evaluados.....	8
1.6.4 Subpoblaciones espermáticas.....	9
1.7 Conservación de las especies.....	9
1.8 Criopreservación del material genético.....	10
1.9 Criopreservación seminal.....	11
1.10 Composición general de un diluyente.....	13
1.10.1 Crioprotectores: yema de huevo y glicerol.....	13
1.10.2 Otros aditivos necesarios en los diluyentes.....	15
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. Estrategia de la investigación.....	18

4.1 Procedimientos experimentales.....	18
5. Materiales y métodos generales.....	20
5.1 Localización y manejo de los animales.....	20
5.2 Animales utilizados.....	20
5.3 Procedimientos generales.....	23
5.3.1 Anestesia.....	23
5.3.2 Colección de semen.....	23
6.Capítulo 1: Caracterización de semen de venado de campo.....	24
6.1 Introducción.....	24
6.2 Objetivo.....	25
6.3 Objetivos específicos.....	25
6.4 Materiales y métodos.....	26
6.4.1 Caracterización seminal.....	26
6.4.2 Espermiograma básico.....	26
6.4.3 Parámetros morfométricos.....	27
6.4.4 Análisis estadístico.....	28
6.5 Resultados.....	30
6.5.1 Espermiograma.....	30
6.5.2 Parámetros morfométricos.....	32
6.5.3 Subpoblaciones espermáticas.....	34
6.6 Discusión.....	36
6.7 Conclusiones.....	40
7.Capítulo II: Comparación de diluyentes para la criopreservación de semen de venado de campo.....	41
7.1 Introducción.....	41
7.2 Objetivo.....	43
7.3 Materiales y métodos.....	44
7.3.1 Nomenclatura de las muestras.....	44
7.3.2 Congelación.....	44
7.3.2.1 Evaluación seminal general.....	44
7.3.2.2 Refrigeración y congelación general.....	45
7.3.3 Descongelación.....	45
7.3.4 Análisis estadístico.....	46

7.4 Experimento 1.....	47
7.4.1 Objetivo.....	47
7.4.2 Materiales y métodos.....	47
7.4.2.1 Animales.....	47
7.4.2.2 Diluyentes utilizados.....	47
7.4.3 Resultados	47
7.4.3.1 Calidad de la motilidad y motilidad espermática.....	47
7.4.3.2 Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosómica.....	48
7.5 Experimento 2.....	51
7.5.1 Objetivo.....	51
7.5.2 Materiales y métodos.....	51
7.5.2.1 Animales.....	51
7.5.2.2 Diluyentes utilizados.....	52
7.5.3 Resultados.....	52
7.5.3.1 Calidad de la motilidad y motilidad espermática.....	52
7.5.3.2 Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosómica.....	54
7.6 Discusión: Experimento 1 y 2.....	55
7.7 Conclusiones.....	57
8. Discusión general.....	58
9. Conclusiones generales.....	59
10. Referencias bibliográficas.....	60
11. Anexo.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Área

An: Ancho

ANOVA: Análisis de varianza

ASMA: Automated Sperm Morphology Analysis

CASA: Computer Assisted Sperm Analysis

CASMA: Computer Assisted Sperm Motility Analysis

CITES: Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre.

DPX: ftalato de dibutilo xileno

ECFA: Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar

EE: Electroeyaculación

E-N: Eosina nigrosina

FTG: Fructosa Tris Glicina

Fun1: (L/An)

Fun2: $[4\pi A/(P^2)]$

Fun3: $[(L-An)/(L+An)]$

Fun4: $[(\pi LAn)/(4A)]$

HOS: Técnica de hipoósmosis

L: Largo

P: Perímetro

p2a: $(P^2/4\pi A)$

RSIQ: Rango semi-intercuartil

T₀: Evaluación de muestras de semen recién colectado

T₁: Evaluación de muestras inmediatamente luego de completar la dilución en cada uno de los tratamientos

T₂: Evaluación de las muestras luego del enfriado a 5 ° C

T₃: Evaluación de las muestras luego de la descongelación

T₄: Evaluación de las muestras luego de una hora posdescongelación

T₅: Evaluación de las muestras luego de dos horas posdescongelación

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

VA: Vagina artificial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Machos adultos de venado de campo pertenecientes a la población de la ECFA.....	2
Figura 2. Relación entre la calidad de la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides móviles, y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y la longitud de la cabeza de los espermatozoides de semen de venado de campo	33
Figura 3. Calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva y diluidos con Andromed o Triladyl.....	49
Figura 4. Porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas y porcentaje de espermatozoides con su acrosoma íntegro de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva y diluidos con Andromed o Triladyl.....	50
Figura 5. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva, y diluidos con Andromed o Triladyl.....	51
Figura 6. Calidad de la motilidad, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de semen de venado de campo colectado durante la estación no reproductiva y diluidos con FTG....	53
Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas y porcentaje de espermatozoides con su acrosoma íntegro de semen de venado de campo colectado durante la estación no reproductiva y diluidos con FTG....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de colecciones seminales realizadas para la caracterización seminal.....	22
Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides con anomalías morfológicas de la cabeza, pieza media y cola de semen de venado de campo colectado durante la estación reproductiva	31
Tabla 3. Parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de venado de campo de muestras colectadas durante la estación reproductiva.....	32
Tabla 4. Relación entre los parámetros morfométricos y la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides anormales de muestras seminales de machos de venado de campo.....	34
Tabla 5. Parámetros morfométricos de las subpoblaciones espermáticas de acuerdo a los parámetros morfométricos de sus cabezas obtenidas a través de un análisis de clusters.....	35

RESUMEN

A pesar de que el venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) es una especie en peligro de extinción, hasta el momento el desarrollo y la aplicación de biotecnologías reproductivas para su preservación han sido muy escasos. Los objetivos de esta tesis fueron caracterizar el semen de venado de campo a partir de muestras colectadas durante la estación reproductiva, y comparar la efectividad de diferentes diluyentes para la criopreservación seminal durante diferentes estaciones del año. Se obtuvieron muestras seminales de machos adultos bajo anestesia mediante electroeyaculación. En el primer trabajo se evaluó las características seminales del venado de campo, incluyendo el espermiograma básico y la determinación del tamaño y la forma de la cabeza de los espermatozoides. A su vez se determinó la relación de los parámetros morfométricos entre las variables espermáticas, la repetibilidad de los parámetros morfométricos entre diferentes colecciones y la presencia de subpoblaciones espermáticas a partir de semen colectado durante la estación reproductiva. En el segundo trabajo se evaluó la utilización de 2 diluyentes comerciales, Andromed o Triladyl, para la criopreservación de semen a partir de muestras colectadas durante la estación reproductiva, y de un diluyente casero (FTG) adicionado con 10% o 20% de yema de huevo a partir de muestras colectadas fuera de la estación reproductiva. La media del volumen eyaculado fue $413,9 \pm 51 \mu\text{l}$, con una concentración de $792,2 \pm 96,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL (media \pm EE). La calidad de la motilidad fue de $3,4 \pm 0,2$, el porcentaje de espermatozoides móviles fue de $69,1 \pm 3,2 \%$ y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue de $59,4 \pm 3,7 \%$. Además, el $63,3 \pm 3,1 \%$ de los espermatozoides presentó anomalías morfológicas y el $23,7 \pm 2,3 \%$ de los espermatozoides tenía su acrosoma dañado. El largo de la cabeza de los espermatozoides fue $7,6 \pm 0,01 \mu\text{m}$, el ancho $4,4 \pm 0,01 \mu\text{m}$, el área $28,1 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$ y el perímetro fue $21,9 \pm 0,04 \mu\text{m}$, identificándose 3 subpoblaciones espermáticas. Existió una relación positiva entre los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides y la calidad de la motilidad ($R = 0,54$; $p = 0,03$), el porcentaje de espermatozoides móviles ($R = 0,54$; $p = 0,03$) y móviles progresivos ($R = 0,53$; $p = 0,03$). Además el largo ($R = 0,79$; $p = 0,011$), ancho ($R = 0,86$; $p = 0,003$), área ($R = 0,83$; $p = 0,006$) y perímetro ($R = 0,59$; $p = 0,009$) de la cabeza de los espermatozoides estuvieron relacionados positivamente en 2 colecciones diferentes. El diluyente Triladyl protegió mejor que Andromed la motilidad espermática ($p = 0,05$) y tendió a ser mejor

en la protección de la calidad de la motilidad ($p = 0,10$), la motilidad progresiva ($p = 0,07$), y la integridad de membrana ($p = 0,09$) de los espermatozoides. El porcentaje de yema de huevo (10% o 20%) adicionado al FTG no generó diferencias en la criopreservación. Se caracterizó el espermiograma básico, el que presentó una alta variabilidad en la mayoría de sus variables, baja concentración, volumen, calidad espermática y alto porcentaje de anormalidades morfológicas, lo que es una limitante para su criopreservación. La determinación de los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides, así como la existencia de subpoblaciones, y la relación encontrada entre diferentes colecciones y los parámetros morfométricos del tamaño de la cabeza de los espermatozoides proveen información valiosa tanto para la evaluación del semen fresco como para mejorar la criopreservación. El diluyente Triladyl preservó mejor que Andromed las muestras de semen colectadas durante la estación reproductiva. Con los diluyentes testados no se logró criopreservar adecuadamente el semen de venado de campo fuera de la estación reproductiva.

SUMMARY

Although pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) is an endangered species, there is very scarce information on reproductive biotechnologies for preservation. The objectives of this thesis were to characterize pampas deer sperm from samples collected during the breeding season, and to compare the effectiveness of different extenders for semen cryopreservation during the breeding and the non-breeding seasons. Sperm were collected from adult males under general anesthesia by electroejaculation. In the first study the basic spermogram and the size and shape of the sperm head were determined. In addition, the relationship between morphometric data and sperm variables, the repeatability of the sperm head morphometric descriptors among different collections, and the existence of sperm subpopulations were determined. In the second study samples collected during the breeding season were diluted with 2 commercial extenders (Andromed or Triladyl), and samples collected during the non-breeding season were diluted with a lab-prepared extender (FTG) with the addition of 10 % or 20 % of egg yolk. Ejaculated volume was $413.9 \pm 51.0 \mu\text{l}$, and the sperm concentration was $792.2 \pm 96.2 \times 10^6$ sperm/mL (mean \pm SEM). The motility score was 3.4 ± 0.2 , and the percentage of sperm with progressive motility was 59.4 ± 3.7 %. Also, 63.3 ± 3.1 % of the sperm were morphologically abnormal, and 23.7 ± 2.3 % had acrosome damage. The sperm head length, width, area and perimeter were $7.6 \pm 0.01 \mu\text{m}$, $4.4 \pm 0.01 \mu\text{m}$, $28.1 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$, and $21.9 \pm 0.04 \mu\text{m}$ respectively, identifying three sperm subpopulations. There was a positive relationship among morphometric descriptors and the motility score ($R = 0.54$, $p = 0.03$), overall motility ($R = 0.54$, $p = 0.03$) and progressive motility ($R = 0.53$, $p = 0.03$). Length ($R = 0.79$, $p = 0.011$), width ($R = 0.86$, $p = 0.003$), area ($R = 0.83$, $p = 0.006$) and perimeter ($R = 0.59$, $p = 0.009$) of sperm head recorded in two different collections were positively related. Triladyl was better than Andromed protecting sperm motility ($p = 0.05$), and tended to be better in protecting the quality of motility ($p = 0.10$), progressive motility ($p = 0.07$) and membrane integrity ($p = 0.09$) of the sperm. The percentage of egg yolk (10 % vs 20%) added to FTG did not affect the effectiveness of cryopreservation of out-of-season collected samples. The basic spermogram was characterized, the low concentration, small volume, sperm quality, great incidence of abnormal morphology and wide variation for these variables limits sperm cryopreservation. The sperm head

morphometric descriptors, the existence of sperm subpopulations and the consistent of morphometric data among different collections provides valuable information for the evaluation of fresh sperm, and possibly improves cryopreservation. Triladyl preserved better than Andromed the samples obtained during the breeding season. The samples collected out of season could not be adequately preserved with the tested extenders.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Situación actual y distribución del venado de campo

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758) es un cérvido autóctono cuya población ha disminuido considerablemente (González et al. 2010). Desde 1975, la convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre lo incluye en su Apéndice I, lo que implica considerarlo como una especie amenazada de extinción (CITES, 2013). A su vez, la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) cataloga a la especie como casi amenazada (UICN, 2014).

Se ha reportado la existencia de pequeñas poblaciones de la especie en Argentina [Bahía Samborombón (Vila & Beade, 1997), Corrientes (Parera & Moreno, 2000), San Luis (Dellafiore et al. 2003), Santa Fé (Pautasso et al. 2002)], Brasil (Carvalho, 1973; Góss-Braga, 1999) y Uruguay (González, 1993; Cosse, 2001). En Uruguay existen dos subespecies endémicas (González et al. 1998; 2002): *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis* en el Departamento de Rocha, y *Ozotoceros bezoarticus arerunguaensis* en el Departamento de Salto. Además, en la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA), Maldonado, Uruguay (34°48' S, 55°14' O; altitud: ~ 200 m; a unos 6000 m de la costa) se cuenta con una población en semicautiverio de aproximadamente 80 animales, la que depende de la Intendencia Departamental de Maldonado. Dicha población se originó a partir de 7 animales capturados (3 machos y 4 hembras) en 1981 y 14 animales (5 machos y 9 hembras) capturados en 1982, todos menores de un mes pertenecientes a la población de Salto (*O. b. arerunguaensis*), de los que 5 (2 machos y 3 hembras) murieron antes de alcanzar la edad reproductiva. En la ECFA los animales se manejan en grupos de machos, o en harenes de un macho con 5 - 8 hembras y sus crías, alojados en encierros de 0,5 - 1 ha.

1.2 Características generales de la especie

El venado de campo es un mamífero perteneciente a la familia *Cervidae*, que habita praderas abiertas con pasturas nativas. Comparado con otros cérvidos posee un tamaño medio. Los animales son de color bayo, a excepción de la zona ventral del

abdomen, tórax, cuello, la región que rodea los ojos y la boca, que son de color blanco (Figura 1). Los machos son de mayor tamaño que las hembras, y presentan astas que son renovadas anualmente (Jackson, 1986, 1987). Aunque no se presentan datos individuales ni información sobre la forma de colección de los datos, se ha reportado que en las poblaciones silvestres los machos presentan una longitud de 130 cm (desde la punta de la nariz a la base de la cola), una altura a la cruz de 75 cm, y un peso de 35 kg (Jackson, 1988). Sin embargo, los machos alojados en la ECFA poseen un tamaño menor: 90 - 100 cm de largo, una altura a la cruz de 65 - 70 cm y un peso de 30 - 35 kg (Ungerfeld et al. 2011). La disposición general de los órganos genitales masculinos es similar a la de otros rumiantes. Sin embargo, a diferencia de los rumiantes, el escroto no es penduloso y el pene no posee flexura sigmoidea (Pérez et al. 2013). Éstos animales poseen un mayor desarrollo de la túnica dartos y un menor desarrollo de las glándulas vesiculares y ampulares (Pérez et al. 2013). Cabe destacar que el peso de los testículos (11,8 g) es bastante menor que el de los carneros (130 - 160 g), y que el testículo derecho de los venados de campo es más pesado que el izquierdo, existiendo una relación positiva entre el peso corporal y el peso de ambos testículos (Pérez et al. 2013).



Figura 1. Machos adultos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) pertenecientes a la población de la ECFA.

1.3 Estacionalidad reproductiva

En la mayoría de los mamíferos de expectativa de vida larga, el fotoperiodo es la señal ambiental que determina el patrón reproductivo estacional (Goldman, 2001; Asher, 2011). La estacionalidad reproductiva de los ciervos varía dependiendo de la especie y de la ubicación geográfica que habiten. Esto implica que existan cérvidos que no poseen una estación reproductiva marcada y otros que presentan patrones estacionales muy marcados (Lincoln & Short, 1980; Bronson, 1989). Los machos deben adelantarse a los cambios estacionales de las hembras, ya que tienen que estar preparados reproductivamente para cuando éstas comiencen a ciclar. En los machos, se producen cambios en el peso corporal, el tamaño testicular, y el perímetro del cuello (Lincoln et al. 1972; Clutton-Brock et al. 1982). Asociado al aumento de la concentración de testosterona que va a comenzar antes de la estación reproductiva, ocurre un aumento del número de espermatozoides en el eyaculado y simultáneamente se observa el mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (Haigh et al. 1984; Asher et al. 1987; Gosch & Fischer, 1989; González-Pensado, 2011). Además, se han descrito cambios estacionales en el diámetro de los túbulos seminíferos y del epidídimo, en el número de espermatogonias en los túbulos seminíferos, y en el tamaño, peso y actividad de las glándulas sexuales secundarias (Lincoln, 1971; Reyes et al. 1997).

El ciclo de las astas de los ciervos también se relaciona en forma directa con el ciclo reproductivo de los machos a través de los cambios en la concentración sérica de testosterona a lo largo del año (Bubenik, 1991; Asher, 2011). Se ha reportado que la caída de las astas ocurre cuando la concentración de testosterona comienza a disminuir, y la caída de la felpa se produce en el período de altas concentraciones de testosterona (Bubenik, 2006). Ungerfeld et al. (2008) observaron que los machos adultos de venado de campo en la ECFA pierden las astas en el mes de agosto, momento en que comienza el crecimiento de nuevas astas. La segunda punta emerge a mediados de setiembre y pierden la felpa aproximadamente el 15 de noviembre. Éstos autores a su vez describen que la caída de la primer asta de machos juveniles (un año de edad) ocurre después que en los machos adultos (Ungerfeld et al. 2008).

1.4 Parámetros reproductivos del macho de venado de campo

A partir de observaciones realizadas en la ECFA no publicadas es posible sugerir que los machos nacidos en primavera no son sexualmente maduros en el siguiente otoño, alcanzando la pubertad recién luego del año de edad. Los machos alcanzan su peso máximo alrededor de los 4 años de edad, pero el volumen testicular y el índice gonadosomático (IGS, volumen de ambos testículos/peso del individuo) máximo lo alcanzan antes de esa edad. A su vez, la concentración máxima de testosterona la alcanzan recién a los 6 años de edad (Ungerfeld et al. 2011). Por tanto, por más que alcancen su potencial reproductivo tempranamente, el crecimiento de los machos es un proceso relativamente lento.

Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, así como la calidad espermática varían en función de la estación del año, siendo mínimos durante la primavera y máximos durante el otoño (González-Pensado, 2011). A su vez, el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor durante el verano. En coincidencia con estos datos, se encontró que los machos adultos presentaron una concentración de testosterona mayor durante el otoño, obteniendo los menores valores en invierno y primavera (González-Pensado, 2011). Por lo tanto, existe una estacionalidad en los parámetros reproductivos de los machos, la que debe considerarse para evaluar las características del semen, así como para decidir cuál período del año es más adecuado para realizar ensayos de criopreservación en dichas muestras.

1.5 Colección de semen

Las muestras de semen se pueden coleccionar de varias formas: vagina artificial (VA), masaje transrectal (manual o ecoguiado) de las glándulas anexas (vesícula seminal, glándulas bulbouretrales y ampolla de Henle), electroeyaculación (EE), o a partir de la cola del epidídimo en animales pos mortem (Durrant, 1990, 2009). En la mayoría de los animales de producción se utiliza la VA, ya que es un método indoloro. Además proporciona eyaculados con menor volumen y mayor concentración de espermatozoides en comparación con el resto de los métodos mencionados anteriormente (Memon et al. 1986; Persson et al. 2007). En algunas especies de cérvidos se han obtenido buenos resultados al extraer semen mediante

VA (Cortes et al. 1996; Durrant, 2009), pero esto implica criar animales en cautiverio, y enseñarles a eyacular dentro de la vagina. Para dicho procedimiento es necesario entrenar a un operario, e igual puede ser un procedimiento riesgoso ya que los ciervos pueden ser agresivos y provocar graves lesiones si no son debidamente controlados.

Dada la dificultad del uso de la VA, en general en cérvidos se colecta el semen mediante EE. La EE ha sido utilizada con éxito en varios cérvidos, como el ciervo del padre David (*Elaphus davidianus*: Asher et al. 1988a), ciervo gamo (*Dama dama*: Asher et al. 1988b; Mulley et al. 1988), ciervo rojo (*Cervus elaphus*: Haigh et al. 1984) y el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*: Jacobson et al. 1989). La EE es un proceso de electroestimulación mediante una sonda rectal provista de varios electrodos, que emite pulsos eléctricos de corta duración y de intensidad creciente, intercalados con breves períodos de descanso. Para esto, en animales que no son dóciles es necesario trabajar con el animal anestesiado (Umapathy et al. 2007; Martínez-Pastor et al. 2009; Fumagalli et al. 2012). La anestesia puede influir en la producción seminal debido a los efectos de las drogas sobre los mecanismos neuromusculares involucrados en la erección y en la eyaculación (Meltzer et al. 1988). Además, al utilizar EE se corre el riesgo de contaminar la muestra con orina, por lo que se recomienda tener varios recipientes de colecta para evitar que se pierda la totalidad de la muestra seminal. Las muestras obtenidas mediante EE presentan una menor calidad (Leboeuf et al. 2000) y una menor concentración espermática (Giulini et al. 2004; Durrant et al. 2009), así como un elevado pH (Memon et al. 1986) en comparación con muestras colectada por otros métodos. A su vez, la calidad de semen luego de la descongelación de muestras colectadas con EE es menor que la obtenida con VA (Greyling & Grobelaar, 1983).

1.6 Características seminales

Los mamíferos presentan una gran heterogeneidad en sus parámetros seminales (Cummins & Woodall 1985; Comizzoli et al. 2012). Del mismo modo, existe una gran variabilidad en los parámetros seminales entre las diferentes especies de cérvidos (ver revisión: Drion et al. 2003), así como entre los machos de una misma especie (Giuliano et al. 2008). En forma general, las especies de menor tamaño corporal producen menor volumen de eyaculado (Santymire et al. 2006; Aleuy,

2008) que las especies de mayor tamaño corporal (Kiso et al. 2011). Sin embargo la concentración espermática y el total de espermatozoides en el eyaculado parecería no estar relacionado con el tamaño corporal (Comizzoli et al. 2012). El parámetro que menos fluctúa entre las especies es el pH, manteniéndose cerca de un valor neutral (pH = 7,0) o levemente alcalino (Comizzoli et al. 2012).

1.6.1 Espermiograma: evaluación subjetiva de la motilidad

Al momento de realizar un espermiograma básico, se debe estandarizar como se va a evaluar la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

La calidad de la motilidad es un parámetro que se puede evaluar subjetivamente mediante microscopio óptico con contraste de fase a 400x, colocando una muestra seminal en un porta – objeto y cubriéndole con un cubre – objeto. Dicha evaluación se realiza utilizando una escala del 0 al 5 (Soler et al., 2003a), considerando:

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

La calidad de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles se observan mediante microscopía óptica, en lo posible con contraste de fase, bajo un cubre-objeto, observando varios campos (Evans & Maxwell, 1987). Los espermatozoides con motilidad progresiva se evalúan de forma similar, observando el porcentaje de espermatozoides móviles que poseen una motilidad progresiva, es decir rectilínea.

Los espermatozoides pueden tener 3 tipos de movimientos:

- movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición
- movimiento circular o rotatorio
- movimiento progresivo, hacia adelante

Tanto la velocidad como el tipo de movimiento pueden variar según el método de obtención del semen. Los factores ambientales, el manejo y el intervalo de tiempo de valoración del semen después de la obtención, así como las variaciones

individuales del propio macho pueden modificar los parámetros del semen. A su vez en muchas especies influyen las variaciones estacionales, las que además determinan diferencias en la capacidad de fecundación (Asher, 2011).

1.6.2 Espermiograma: evaluación objetiva de la motilidad y de la morfometría espermática

Los sistemas automáticos de análisis de imágenes (CASA; Computer-Assisted Sperm Analysis) (Boersma & Braun, 1999), se han desarrollado para evaluar los parámetros de motilidad (CASMA; Computer-Assisted Sperm Motility Analysis) y de morfometría espermática (ASMA; Automated Sperm Morphology Analysis). El uso de estos sistemas permite determinar características espermáticas que serían difíciles de detectar por un operador de forma objetiva, siendo de gran utilidad en el análisis detallado de los parámetros morfológicos de los espermatozoides (Soler et al. 2003b). Si bien no es una técnica utilizada de rutina al evaluar el espermiograma básico, se lo ha utilizado con éxito para analizar los valores de motilidad y de morfometría espermática en varias especies (Casey et al. 1997; Estes et al. 2003; Malo et al. 2005).

Una de las ventajas de utilizar herramientas computacionales es que proporcionan información individualizada tanto de la cabeza, pieza media, como de la cola de los espermatozoides. Esto permite obtener información más detallada de las características del eyaculado de cada macho. A través de estas evaluaciones se ha logrado estudiar las diferencias existentes en la morfometría de los espermatozoides entre varias especies de mamíferos (Cummins & Woodall, 1985), así como diferencias morfométricas dentro de una misma especie (Casey et al. 1997; Hirai et al. 2001; Soler et al. 2014). Se ha observado una relación positiva entre el tamaño de la cabeza de los espermatozoides y la motilidad espermática (Gomendio & Roldan, 1991; Malo et al. 2006; Ramón et al. 2013). A su vez se han encontrado diferencias en el tamaño de la cabeza de los espermatozoides de machos fértiles e infértiles (Casey et al. 1997; Gravance et al. 1996), y diferencias durante el proceso de criopreservación (Estes et al. 2003, 2006; Gravance et al. 2009).

1.6.3 Espermograma: otros parámetros a ser evaluados

La evaluación del espermograma también incluye la evaluación del pH con tiras colorimétricas o pH metro, y el volumen mediante micropipeta calibrada.

Para observar la integridad de membrana se tiñen frotis con eosina-nigrosina (E-N) o mediante la técnica de hipoósmosis (HOS). La E-N tiñe los espermatozoides que poseen dañada su membrana de rosado (positivos a la técnica) (Campbell et al. 1956). La técnica de HOS consiste de la incubación de una muestra de semen en una solución hipoosmótica (100 mOsm), siendo la membrana funcional (HOS +) cuando se observa al espermatozoide cambiar de forma, es decir cuando se visualiza algún enrollamiento de la cola (Jeyendran et al. 1984).

Las anomalías morfológicas de los espermatozoides se pueden clasificar según su origen en primarias, cuando se produjeron durante la espermatogénesis; en secundarias, cuando el daño ocurrió durante la maduración y el transporte a lo largo del epidídimo; y terciarias, las provocados durante la eyaculación o por el manejo inadecuado de la muestra seminal (Barth & Oko, 1989). Existe una segunda forma de clasificar las anomalías, dividiéndolas en anomalías mayores o menores (Bloom, 1972). Las clasificaciones anteriores no consideran la integridad del acrosoma de los espermatozoides, la que es indispensable para que ocurra una correcta fecundación (Eddy, 2006). Para evaluar la integridad del acrosoma se observa si el acrosoma se encuentra íntegro, dañado o desprendido. La evaluación de la morfología de los espermatozoides se debe realizar utilizando un microscopio óptico con contraste de fase a partir de muestras teñidas o fijadas. La evaluación de una muestra seminal realizada por un técnico entrenado es bastante precisa. Sin embargo, existen variaciones mínimas en el tamaño de los espermatozoides o en la velocidad de movimiento de los espermatozoides que no van a ser detectadas por el operador, por lo que utilizar herramientas computacionales puede ayudar a obtener un resultado más preciso.

1.6.4 Subpoblaciones espermáticas

En el eyaculado coexisten espermatozoides que poseen diferencias en las características de la membrana plasmática (Paasch et al. 2003; Petrunkina et al. 2007), en la integridad del acrosoma (Perez-Llano et al. 2003), la motilidad (Quintero-Moreno et al. 2003), e incluso en la morfometría (Cummins & Woodall, 1985; Estes et al. 2009). Estas diferencias pueden estar asociadas con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Casey et al. 1997). La heterogeneidad en las características morfométricas de los espermatozoides se puede determinar empleando los sistemas ASMA (Estes et al. 2009).

En varias especies se ha demostrado la existencia de subpoblaciones espermáticas dentro del eyaculado (Petrunkina & Töpfer-Petersen, 2000; Estes et al. 2009; Soler et al. 2014), las que pueden repercutir positiva o negativamente en la capacidad fecundante del semen (Casey et al. 1997). A su vez, la existencia de subpoblaciones espermáticas puede ser una herramienta para predecir la resistencia de los espermatozoides frente a un proceso de criopreservación (Quintero-Moreno et al. 2003; Núñez-Martínez et al. 2006).

1.7 Conservación de las especies

La extinción de mamíferos es parte del proceso evolutivo natural de las especies, pero este proceso está ocurriendo a una tasa más elevada como consecuencia de actividades humanas, lo que incluye la destrucción del hábitat, la caza indiscriminada, o la competición al introducir otras especies en su hábitat (Holt & Pickard, 1999). Por dicho motivo, un objetivo de los programas de conservación es mantener la biodiversidad (Wildt et al. 1997; Loi et al. 2001). La conservación *in situ* es la que se realiza en el mismo hábitat, la que permite conservar las especies dentro de un ecosistema. Pero en muchos casos se generan problemas en función de la selección de hábitats para proteger y la necesidad de recursos económicos necesarios para mantener la protección a largo plazo. La conservación *ex situ* tampoco ofrece una solución definitiva para preservar la diversidad genética (Wildt, 1992). Los programas de cría en cautividad muchas veces se inician como una respuesta de emergencia a una extinción inminente, generalmente conociendo poco sobre la biología reproductiva de la especie, lo que en algunos casos dificulta el

éxito reproductivo. La conservación *ex situ* puede incluir el uso de biotecnologías reproductivas. Dentro de éstas cabe destacar la inseminación artificial, la fecundación *in vitro*, la transferencia de embriones, así como la criopreservación de gametos y cigotos (Holt & Pickard, 1999). Uno de los problemas más grandes con la implementación de los programas de conservación “*in situ*” y “*ex situ*” es la falta de material biológico disponible, lo que es necesario para determinar los parámetros reproductivos, para así poder maximizar la eficiencia reproductiva (ver revisión: Andrabi & Maxwell, 2007).

La existencia de endogamia ha sido reconocida desde hace tiempo, en ciertas especies que se mantienen en cautiverio e incluso en algunas especies domésticas (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Thornhill, 1993). Los problemas de endogamia producen una disminución de la fertilidad, así como un aumento en la mortalidad de las crías (Ralls et al. 1979; Ralls & Ballou, 1986). Esto ocurre porque la endogamia afecta la viabilidad genética de las poblaciones pequeñas, perdiendo rápidamente la diversidad en cada generación a una tasa que es inversamente proporcional al tamaño de la población. Se ha demostrado que los machos que poseen altos coeficientes de endogamia sufren una reducción en la proporción de espermatozoides móviles, en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (Roldan et al. 2006).

1.8 Criopreservación de material genético

El desarrollo de bancos genéticos permite la criopreservación de semen, ovocitos, embriones, así como tejidos, facilitando el manejo genético de las especies en peligro de extinción (Comizzoli & Wildt, 2014). La existencia de dichos bancos reduce considerablemente el número de individuos vivos que son necesarios para mantener una población viable. Al mismo tiempo, reduce la cantidad de espacio necesario para criar una especie, minimizando de esta manera los costos y aumentando el número de especies que pueden beneficiarse de los programas de mejoramiento genético (Johnston & Lacy, 1995).

La principal ventaja de los bancos genéticos es que pueden mantener la diversidad genética de una especie casi indefinidamente, permitiendo utilizar el

material genético durante muchos años después de la muerte de un animal. La criopreservación puede extender el tiempo generacional de las poblaciones en cautiverio, permitiendo que poblaciones pequeñas retengan una mayor diversidad genética (Ballou, 1992). Los efectos de la criopreservación en el tiempo generacional van a depender de cuantas muestras puedan ser criopreservadas y de la efectividad de reintroducir esas muestras en la población. La criopreservación de material genético de especies en peligro de extinción solo contribuirá si se realizan avances en técnicas reproductivas que permitan la aplicación rutinaria de técnicas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones de las células criopreservadas. Para la aplicación de dichas técnicas es necesario conocer las características reproductivas así como los protocolos de criopreservación que sean más adecuados para cada especie.

1.9 Criopreservación seminal

Los bancos de semen han sido desarrollados para razas domésticas, como el bovino, ovino, caprino y porcino, pero luego se han expandido a especies en peligro de extinción (Wildt, 1992; Wildt et al. 1997). La ventaja de trabajar con semen congelado es que se puede congelar la muestra por un tiempo indefinido, permite un mejor control en cuanto al riesgo sanitario, facilita el intercambio de material genético entre poblaciones, y permite utilizar el semen para inseminar fuera de la estación reproductiva. Sin embargo hay que considerar que la viabilidad del semen y su capacidad de fertilidad son menores que las del semen fresco (Watson, 2000) y que la crioresistencia de los espermatozoides puede estar influida por la composición y/o proporción de aditivos del diluyente utilizado, así como por la estación del año (Coloma et al. 2010). Por ello es indispensable evaluar protocolos de criopreservación que permitan optimizar el número de espermatozoides viables luego de la criopreservación

La conservación de semen requiere la reducción o detención del metabolismo de las células espermáticas con el fin de prolongar su viabilidad. Además, los espermatozoides que sobreviven a un proceso de criopreservación pueden tener alterada la estructura o las propiedades de membrana, ya que estos procesos producen efectos similares a la capacitación o a la reacción acrosómica (Watson, 1995).

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides van a ser sometidos a una serie de eventos estresantes, los que pueden inducir daños en la célula espermática comprometiendo su funcionalidad. Los períodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación ocurren en la fase inicial de la congelación y en la fase de descongelación (ver revisión: Mazur, 1984). Los cambios que se producen en la membrana de los espermatozoides durante el proceso de congelación ocurren por alteraciones térmicas, mecánicas y químicas. Los daños en las membranas plasmáticas se deben a la pérdida de la fluidez de sus componentes lipídicos, dándole un alto grado de fragilidad durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación (ver revisión: Mazur, 1984). A su vez, puede presentarse una pérdida de lípidos, lo que afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al regresar a condiciones isotónicas (Holt, 2000a).

La incorporación de sustancias crioprotectoras, así como el proceso de congelación producen cambios en el volumen de los espermatozoides, los que son revertidos al momento de realizar la descongelación. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular (ver revisión: Mazur, 1984). La forma en la cual los espermatozoides reaccionan a estas modificaciones va a determinar la capacidad de esas células para soportar el estrés al cual se las sometió.

Dado que los cambios de temperatura durante la criopreservación pueden afectar la viabilidad espermática, se deben elaborar protocolos que permitan afrontar adecuadamente esos cambios. Para evitar daños graves se debe utilizar un crioprotector que permita que el agua intracelular salga al exterior y se congele durante el proceso de criopreservación permitiendo la supervivencia de un mayor número de espermatozoides (Gao & Crister, 2000). Las células se van a deshidratar evitando que se formen cristales de hielo. La velocidad con la que se realiza la congelación debe ser evaluada para cada especie. Si la velocidad de congelación es demasiado lenta o demasiado rápida el estrés que van a tener que resistir los espermatozoides es mayor (ver revisión: Mazur, 1984). Por lo anteriormente mencionado, para que la criopreservación sea efectiva debe utilizarse un diluyente que brinde un ambiente idóneo para los espermatozoides y que favorezca la máxima sobrevivencia espermática tras los procesos de refrigeración, congelación y descongelación.

1.10 Composición general de un diluyente

Los diluyentes deben aportar un sustrato energético apropiado para el metabolismo de los espermatozoides, y mantener el pH y la osmolaridad de acuerdo a las características del semen de cada especie. A su vez, deben ser capaces de proteger a las células frente a los cambios de temperatura durante todo el proceso de refrigeración-congelación-descongelación, poseer una fuente de energía y estar libre de bacterias y contaminantes. Por ello en la mayor parte de los diluyentes se adicionan glucosa y fructosa como fuentes de energía además de antibióticos (Salamon & Maxweel, 2000). Se deben evitar las fluctuaciones de temperatura, osmóticas, o cambios en la fisiología celular que reduzcan la capacitación de los espermatozoides (Purdy, 2006). Muchos diluyentes utilizados en ciervos han sido adaptados a partir de diluyentes en base a Tris o citrato originalmente desarrollados para pequeños rumiantes domésticos, a los que se les adiciona yema de huevo y glicerol (Asher et al. 2000).

1.10.1 Crioprotectores: yema de huevo y glicerol

Se ha demostrado que la yema de huevo ejerce una acción protectora en los espermatozoides durante los procesos de refrigeración (Watson, 1981), congelación y descongelación (Aboagla & Terada, 2004). El efecto crioprotector de la yema de huevo parece ser consecuencia de la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Watson, 1976; Moussa et al. 2002) y de fosfolípidos que actúan recubriendo la membrana celular (Quinn et al. 1980). El uso de yema de huevo genera inconvenientes por el riesgo sanitario de transmisión de enfermedades (Bousseau et al. 1998). Además es un aditivo cuya composición puede variar dependiendo de la raza y la alimentación de la gallina (Surai et al. 1999), lo que dificulta la estandarización de los protocolos de criopreservación.

La proporción de yema de huevo necesaria para que los espermatozoides se preserven correctamente varía dependiendo de la especie, pero generalmente no supera el 20% (Ritar & Salamon, 1982; ver revisión: Salamon & Maxwell, 1995; Umaphathy et al. 2007). Las proporciones elevadas de yema de huevo pueden producir una disminución de la motilidad y un aumento en la incidencia de daño en el acrosoma de los espermatozoides (Watson & Martin, 1975; Ritar & Salamon,

1982). La yema de huevo no solo protege la membrana de los espermatozoides de carnero contra los cambios bruscos de temperatura (Holt et al. 1992), sino que también previene las colas plegadas y protege la motilidad (Holt et al. 1988). De todas formas, no es efectiva en la criopreservación de los espermatozoides de la mayoría de los caprinos (Roy, 1957) y porcinos (Benson et al. 1967), lo que implicó que se comenzará a perfeccionar la composición de diluyentes que no necesiten su adición. La utilización de un diluyente comercial denominado Andromed que no necesita la adición de yema de huevo ha tenido buenos resultados en ciervo rojo (Martínez-Pastor et al. 2009). Además, al no poseer dicho compuesto se mejora la calidad de observación de la muestra, ya que la dilución es incolora. Por lo anteriormente mencionado se debe de testear en cada especie si la adición de la yema de huevo como un componente más del diluyente es o no beneficiosa.

El crioprotector que ha resultado más efectivo y es más extensamente utilizado en semen de mamíferos es el glicerol (Comizzoli & Wildt, 2014). La membrana de los espermatozoides es permeable al glicerol, por lo que se difunde en el interior de la célula reduciendo el contenido de agua intracelular, con lo que se minimiza la formación de cristales de hielo dentro de la célula (Holt, 2000b). A pesar de que el glicerol protege a los espermatozoides de forma adecuada, es necesario determinar el porcentaje de glicerol a usar en cada especie para una correcta preservación, pero evitando que se vuelva tóxico para los espermatozoides (Hammerstedt et al. 1978). Proporciones mayores o menores a las adecuadas para una especie pueden resultar muy dañinas para los espermatozoides, alterando la estructura de la membrana plasmática, el balance energético de la célula, y la viscosidad citoplasmática (Hammerstedt et al. 1990; Hammerstedt & Graham, 1992). Si bien la toxicidad del glicerol puede causar daño celular, se desconocen los posibles mecanismos involucrados en éste proceso (Rudenko et al. 1984; Katkov et al. 1998), aunque es posible que procesos osmóticos estén involucrados. Fiser & Fairfull (1986) evaluaron los efectos de utilizar diferentes concentraciones de glicerol (0 – 16 %) durante la criopreservación de espermatozoides de carneros. Los mejores resultados se encontraron en aquellas muestras que tenían entre 4 % y 6% de glicerol, encontrando un aumento en la cantidad de espermatozoides con daño celular en las muestras con un porcentaje igual o mayor al 8 %. Si bien en otros estudios se ha encontrado que la concentración óptima de glicerol en un diluyente es entre 4 % y

10 %, esto va a depender de la especie en estudio (Patil et al. 1998; Asher et al. 2000; Jayaprakash et al. 2001).

1.10.2 Otros aditivos necesarios en los diluyentes

El ácido cítrico se ha utilizado como componente de varios diluyentes ya que neutraliza los productos de desecho del metabolismo de los espermatozoides, en especial del ácido láctico; es decir, desempeña una acción buffer efectiva neutralizando la acidez del medio causado por los catabolitos. El ácido cítrico es fijador de calcio, por lo que junto con los iones de sodio y potasio mantienen el equilibrio osmótico, favoreciendo la motilidad de los espermatozoides. La fructuosa es un monosacárido necesario para la supervivencia de los espermatozoides en condiciones anaeróbicas, lo que está estrechamente relacionada con la motilidad de los espermatozoides (Salamon & Maxwell, 2000). La fructosa ha sido utilizada en la composición de diluyentes de varias especies como el ciervo rojo (Fernández-Santos et al. 2007) y el ciervo gamo (Fernández et al. 2013). Khalili et al. (2010) demostraron que los espermatozoides de carneros mejoran su motilidad, la viabilidad, así como la integridad de membrana y acrosómica si se le adiciona glicina al diluyente, aunque no se conocen los mecanismos por los que la glicina mantiene la motilidad de los espermatozoides (He & Woods, 2003). Fernández et al. (2013) obtuvieron porcentajes altos de motilidad y viabilidad espermática posdescongelación al utilizar un diluyente casero compuesto por fructosa, Tris, glicina y 20 % yema de huevo (FTG 20 %).

Una combinación de Tes y/o Tris, citrato, glicerol y yema de huevo, o la utilización de Triladyl, que es un diluyente comercial de composición similar, criopreserva efectivamente los espermatozoides de varias especies de cérvidos (Cheng et al. 2004; Umaphathy et al. 2007; Martínez-Pastor et al. 2009). Sin embargo, dado que la efectividad de los diluyentes varía con la especie (Holt, 2000b), es necesario evaluarlo para el semen de cada especie.

2. HIPÓTESIS

- Los eyaculados del semen de venado de campo presentan una gran heterogeneidad de los parámetros espermáticos y morfométricos.
- La utilización de diferentes diluyentes para la criopreservación seminal del semen de venado de campo afecta de distinta forma los parámetros seminales colectados durante la estación reproductiva y no reproductiva.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Describir las características generales del semen de venado de campo y comparar la efectividad de diferentes diluyentes para su criopreservación en diferentes estaciones del año, a partir de muestras de semen de venado de campo colectadas mediante EE.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el espermograma básico del semen de venado de campo a partir de muestras colectadas durante la estación reproductiva.
- Determinar los principales parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides y relacionarlos con otros parámetros seminales.
- Determinar si los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de un mismo macho se mantienen estables en diferentes colecciones de semen.
- Determinar si existen subpoblaciones espermáticas dentro de los eyaculados de los machos de venado de campo.
- Comparar el resultado de criopreservar semen diluido con Andromed o Triladyl durante la estación reproductiva.
- Comparar la efectividad del diluyente FTG adicionado con 10 % o 20 % de yema de huevo para la criopreservación de semen colectado fuera de la estación reproductiva.

4. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La tesis se realizó en el marco del Proyecto “Biología reproductiva del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) 2: biología reproductiva de los machos, extracción, caracterización, manejo y preservación de semen” financiado por CSIC y la Intendencia Departamental de Maldonado. A pesar de que el venado de campo es una especie en peligro de extinción, hasta el momento el desarrollo y la aplicación de biotecnologías reproductivas para su preservación son muy escasos. Por dicho motivo es indispensable caracterizar el semen de esta especie con el fin de aumentar el conocimiento de sus características para congelar adecuadamente las muestras, ya sea para generar un banco de semen de la especie o para su posterior uso en inseminación artificial. Para que lo anterior ocurra eficientemente no solo deben evaluarse los parámetros del semen fresco sino también determinar cuál/es el/los diluyente/s más adecuado/s para criopreservar el semen de venado de campo.

4.1 Procedimientos experimentales

Para cumplir con los objetivos mencionados, se utilizaron machos alojados en la ECFA, a los que se les realizó colecciones seminales bajo anestesia mediante EE, con el fin de caracterizar el semen de venado de campo durante la estación reproductiva. Luego de haber evaluado los parámetros del espermograma básico y constatar que existía una gran heterogeneidad entre los eyaculados se procedió a analizar los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides. Al igual que en otras especies los parámetros morfométricos mostraron ser heterogéneos, por lo que se evaluó la existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado. A su vez, dado que se contaba con muestras de machos obtenidas en 2 colecciones diferentes, se decidió evaluar si existía repetibilidad de los parámetros morfométricos entre los eyaculados de cada macho.

Como se mencionó previamente el estudio de la caracterización del semen de una especie que se encuentra en peligro de extinción debe ser acompañada de la determinación de que diluyente/s protege/n mejor a los espermatozoides durante todo el proceso de criopreservación (refrigerado-congelación-descongelación). Dado que los diluyentes son especie-específico se testearon 4 diluyentes. Diluyentes

comerciales como el Triladyl y el Andromed han sido utilizados para la criopreservación de semen en pequeños rumiantes. Generalmente los diluyentes a los que se les adiciona yema de huevo criopreservan mejor los espermatozoides en comparación con diluyentes sin yema de huevo. Con el diluyente comercial Triladyl, al que hay que adicionarle 20 % de yema de huevo, se han obtenido buenos resultados posdescongelación en varias especies (Haigh et al. 1993; Garde et al. 2003; Zomborszky et al. 2005). Si bien con el diluyente comercial Andromed (no requiere la adición de yema de huevo) no se han obtenido buenos resultados en algunas especies, existen trabajos en los que se han observado buenos resultados (Martínez-Pastor et al. 2009). A su vez, dado que el diluyente Andromed no requiere la adición de un compuesto de origen animal, como la yema de huevo, su utilización está siendo recomendada para evitar que se transmitan enfermedades entre especies. A partir de estos antecedentes es que se procedió a evaluar las muestras seminales colectadas durante de la estación reproductiva con los 2 diluyentes comerciales mencionados previamente.

Las muestras que fueron colectadas fuera de la estación reproductiva fueron diluidas con 2 diluyentes caseros en base a fructosa, Tris, glicerol (FTG) y yema de huevo. Se han obtenido buenos resultados en ciervo gamo al utilizar un diluyente similar adicionado con 20 % de yema de huevo. Dado que no se sabe que concentración de yema de huevo es la más adecuada para criopreservar el semen de venado de campo se procedió a evaluar FTG adicionado con 10 % (FTG 10 %) y con 20 % de yema de huevo (FTG 20 %).

Las muestras fueron evaluadoas en fresco, luego de adicionar el diluyente, al llegar a los 5 °C, luego de la descongelación, a la hora y a las 2h posdescongelación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

5.1 Localización y manejo de los animales

Para la realización de la tesis se contó con la aprobación de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Veterinaria.

El estudio se realizó en la ECFA, donde se obtuvieron las muestras seminales de machos de venado de campo, así como en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, y en la Universidad de Castilla de la Mancha, España, donde se realizaron parte de las evaluaciones de las muestras. Los animales en la ECFA se encontraban en potreros de 0,5 - 1 ha en grupos de 7 machos como máximo, sin contacto con hembras, con identificación individual y con libre acceso a pasturas naturales, árboles y arbustos que les permiten ramonear y les brindan sombra, además de ración para vacas lecheras en cantidades que se considera *ad libitum* (aprox. 600g/animal/día).

5.2 Animales utilizados

Para el trabajo de caracterización y el de criopreservación se utilizaron machos adultos de venado de campo de 3-7 años de edad.

Las muestras de semen utilizadas para la caracterización seminal se obtuvieron a partir de 18 machos a lo largo de 4 años (2008, 2009, 2010 y 2012) durante la estación reproductiva (enero-abril) totalizando 38 colecciones seminales. Las 38 colecciones se obtuvieron a partir de machos a los que se les realizó de 1 a 5 colecciones a lo largo de los años de estudio (Tabla 1). Para la determinación de la caracterización seminal, se determinó el volumen, color, consistencia y pH del eyaculado, así como la concentración y el total de espermatozoides en el eyaculado. También se determinó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos. Se fijaron muestras para determinar el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas, así como la integridad acrosómica y de membrana de los espermatozoides. Por último se realizaron extendidos para evaluar los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides.

Muestras seminales de 11 machos colectados durante la estación reproductiva (Experimento 1) y de 16 machos colectados fuera de la estación reproductiva (Experimento 2) fueron utilizadas para el trabajo de criopreservación. Las evaluaciones realizadas durante el proceso de criopreservación fueron la determinación de la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y de móviles progresivos, el porcentaje de anomalías morfológicas, así como la integridad acrosómica y de membrana de los espermatozoides. A las muestras recién colectadas (semén fresco) se les determinó el volumen del eyaculado, la concentración espermática y el número total de espermatozoides en el eyaculado.

Un dato a tener en cuenta es que el bajo volumen que presentó el semen de venado de campo impidió en ciertos casos que se continuara con el proceso de evaluación, permitiendo solo la evaluación del semen fresco. A su vez, la concentración espermática fue muy variada entre los machos, por lo que no se logró criopreservar pajuelas con una concentración estandarizada. Dependiendo de la concentración obtenida en el momento se decidió cuántas pajuelas se podrían producir y de qué concentración (cuidando de no excederse de tasas de dilución de 1 + 4 a 1 + 8). En ciertos casos solo se pudo criopreservar una pajuela con cada diluyente.

Tabla 1. Cantidad de colecciones seminales realizadas en 2008, 2009, 2010 y 2012 a los machos de venado de campo para realizar la caracterización seminal.

Animal	Cantidad de colecciones por año				Total colección por macho
	2008	2009	2010	2012	
18		2			2
39				1	1
42				1	1
50				1	1
54	1				1
62				1	1
64	1	2			3
68	2	1			3
69				1	1
79	1	2	1		4
94	1	2			3
95		2			2
96		2	1		3
97		2	1		3
98		2			2
99	2	2	1		5
108				1	1
S/C				1	1
Total	8	19	4	7	38

5.3 Procedimientos generales

5.3.1 Anestesia

Los machos fueron capturados de acuerdo a Fumagalli et al. (2012), con dardos anestésicos lanzados con cerbatana, cargados con 1,6 mg/kg ketamina (Sedomin, Laboratorios König, Buenos Aires, Argentina), 2,0 mg/kg xilacina (Vetanarcol, Laboratorios König, Buenos Aires, Argentina) y 0,013 atropina mg/kg (Sulfato de Atropina, Laboratorio Ion, Montevideo, Uruguay). Cuando la anestesia hizo efecto, el animal fue trasladado a la sala veterinaria donde se monitorearon los signos vitales de forma continua (corazón, pulso, oximetría y temperatura rectal). Inmediatamente, se le extrajo semen mediante EE. Luego de colectar la muestra seminal, el animal fue trasladado aún bajo anestesia al encierro, donde se le administró 0,26 mg/kg de clorhidrato de yohimbina (Reverze, Vetcross, Portinco, Montevideo, Uruguay) vía intravenosa para revertir el efecto anestésico.

5.3.2 Colección de semen

La EE se realizó con una sonda rectal (300 mm de largo x 19 mm de diámetro, con 3 electrodos de cobre longitudinales de 30 mm de longitud) (Modelo 303; P - T Electronics, Oregon, E.E.U.U) 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 aumentando desde 1 V hasta la eyaculación. Previo a realizar la EE, se vació el recto de heces, se lavó el área del prepucio con una solución de suero salino fisiológico y se realizó la exteriorización del pene.

6. CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE VENADO DE CAMPO

6.1 Introducción

Las biotecnologías reproductivas, como la criopreservación de semen, la inseminación artificial o la fecundación in vitro son estrategias utilizadas para preservar las especies en peligro de extinción (Holt & Pickard 1999). Una limitante para implementar dichas biotecnologías en el venado campo es la escasa información acerca de los parámetros reproductivos. Informes preliminares realizados en el semen de venado de campo muestran una gran heterogeneidad al evaluar los espermatozoides, tanto en el volumen del eyaculado (0,1 – 0,6 mL), en el porcentaje de espermatozoides móviles (20 – 70 %), así como en el total de espermatozoides en el eyaculado (34 – 2170 millones de espermatozoides/mL) (Duarte et al. 1993; Ungerfeld et al. 2008). Además de los datos que proporciona el espermiograma básico, los análisis computacionales de los parámetros morfométricos de los espermatozoides (ASMA) proporcionan información que puede vincularse con la motilidad espermática (Malo et al. 2006), la criopreservación (Esteso et al. 2006), así como con la fertilidad potencial de ese semen (Casey et al. 1997). La determinación de los parámetros morfométricos permite evaluar la existencia de subpoblaciones espermáticas. La existencia de subpoblaciones de acuerdo a los datos morfométricos de la cabeza de los espermatozoides ha sido determinada en varias especies: equino (Gravance et al. 1996) canino (Núñez-Martínez et al. 2006), cérvido (Esteso et al. 2009), ovino (Maroto-Morales et al. 2012), camelido (Soler et al. 2014). A su vez, Esteso et al. (2006) reportaron que los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de ciervo rojo disminuyeron su tamaño luego de realizarles un proceso de criopreservación. Estos autores sugirieron que la variabilidad de los parámetros morfométricos podría ser un buen indicador de la resistencia que presentan los espermatozoides frente a los procesos de criopreservación.

6.2 Objetivo

Caracterizar el semen de venado de campo a partir de muestras obtenidas mediante EE durante la estación reproductiva.

6.3 Objetivos específicos

- Caracterizar el espermiograma básico del semen de venado de campo a partir de muestras obtenidas durante la estación reproductiva.
- Determinar los principales parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides y relacionarlos con otros parámetros seminales.
- Determinar si los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de un mismo macho se mantienen estables entre colecciones.
- Determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas en el eyaculado de venado de campo.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Caracterización seminal

Para realizar la caracterización del semen de venado de campo se utilizaron 18 machos de los que se colectó semen durante la estación reproductiva (verano-otoño) a lo largo de 4 años (2008, 2009, 2010 y 2012), totalizando 38 colecciones, de las cuales un macho no dio semen y 3 colecciones fueron contaminadas con orina por lo que se descartaron. Se determinó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. También se realizaron fijaciones en glutaraldehído con 2 % de cacodilato para evaluar el porcentaje de espermatozoides anormales, así como la integridad del acrosoma y de la membrana de los espermatozoides.

La evaluación de los parámetros morfométricos se realizó a partir de muestras fijadas en metanol provenientes de 17 machos. Luego de determinar los valores morfométricos de la cabeza de los espermatozoides, se estudió la existencia de subpoblaciones espermáticas dentro de los eyaculados. A su vez, a partir de los parámetros morfométricos de 9 machos evaluados en 2 colecciones, se determinó si estos datos se repetían entre las colecciones.

6.4.2 Espermiograma básico

Inmediatamente después de la eyaculación, se determinó el color, consistencia, pH (tiras colorimétricas) y volumen del eyaculado (micropipeta; μl), la concentración espermática (conteo manual en cámara de Neubauer; 10^6 espermatozoides/mL) y el total de espermatozoides en el eyaculado (10^6 espermatozoides). También se evaluó la calidad de la motilidad en una escala de 0 a 5 (0: motilidad nula; 5: movimiento progresivo rápido), y la determinación del porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Los parámetros de motilidad fueron evaluados a partir de la observación de 5 campos, colocando 5 μl de semen en un frotis con un cubreobjeto de 18 x 18 mm, utilizando microscopio óptico con contraste de fase (400 x).

El porcentaje de espermatozoides con membrana intacta se determinó mediante dos técnicas: las muestras obtenidas en 2008 y 2009 fueron teñidas con E - N (Campbell et al,

1956), y las muestras obtenidas en 2010 y 2012 fueron incubadas en un medio HOS (Jeyendran et al. 1984). Inicialmente se planteó determinar la integridad de la membrana utilizando E - N, pero luego no se consiguió continuar con el mismo producto, por lo que se optó por utilizar la técnica de HOS. Los frotis para la primera técnica, se prepararon mezclando 5 µl de semen con 10 µl de E - N, y extendiéndolo con un cubre objeto de 20 x 20 mm. Las muestras se observaron con un microscopio óptico a 1000 x (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China). Para realizar la prueba HOS, 10 µl de semen fueron diluidos en 100 µl de solución hipoosmótica (100 mOsm; Jeyendran et al, 1984), incubando la muestra a 37 °C durante 15 min. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2 % con cacodilato. Se consideró que la membrana era funcional (HOS +) cuando los espermatozoides cambiaron de forma, es decir cuando se visualizó algún enrollamiento de la cola. Las muestras fijadas fueron evaluadas con un microscopio óptico con contraste de fase 400 x (Nikon, modelo Eclipse E200, Shanghai, China). Para ambas técnicas se contaron 100 espermatozoides por muestra.

La incidencia de espermatozoides con diferentes anomalías morfológicas y la integridad del acrosoma de los espermatozoides (intacta, dañado o desprendido) se determinó en el laboratorio (microscopio con contraste de fase 400x) a partir de muestras fijadas en glutaraldehído al 2 % con cacodilato (Soler et al. 2005).

6.4.3 Parámetros morfométricos

Se prepararon frotis utilizando 10 µl de semen, los que fueron secados a temperatura ambiente y sumergidos 5 veces durante 1 s en alcohol metílico (metanol para análisis clínico, ACS, Dorwil Química Analítica, Buenos Aires, Argentina). Luego, los frotis se tiñeron en la Universidad de Castilla de la Mancha (España), utilizando Hemacolor® (Merck), a partir de un procedimiento adaptado por Estes et al. (2003) para evaluar espermatozoides de ciervo rojo. Las muestras de semen teñidas fueron montadas de forma permanente con un cubre - objetos con ftalato de dibutilo xileno (DPX). Posteriormente se evaluaron mediante ASMA los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides a través de un módulo comercial (Sperm-Class Analyzer, SCA, versión 99 CAS-MA system; Microptic, Barcelona, España). Para la evaluación se utilizó un microscopio Nikon (Labophot - 2, Tokyo, Japón) y una cámara de vídeo Sony (CCD AVC163 D7CE; Sony Corporation, Tokio, Japón)

conectada a un procesador Pentium 950 MHz. La fuente de iluminación fue centrada, y se estandarizó la intensidad y la ganancia de la luz de la cámara para todas las muestras. La configuración del sistema informático incluyó un tablero digitalizador de vídeo B PIP- 1024 (Matrox Electronic 167 Systems Ltd, Quebec, Canadá), el software de análisis de imágenes de los espermatozoides y un monitor de alta resolución (Sony Trinitron PVM- 1443MD, Sony Corporation). El tamaño de la matriz del marco de vídeo fue de 512 x 512 x 8 bits, las imágenes digitalizadas estuvieron compuestas de 262.144 píxeles (puntos de imagen) y 256 niveles de grises. La resolución de las imágenes fue de 0,15 y 0,11 μm por píxel en los ejes horizontal y vertical, respectivamente.

Se midieron cuatro parámetros morfométricos del tamaño de la cabeza de los espermatozoidez en 100 espermatozoides por muestra: longitud (L), ancho (An), área (A), perímetro (P), y se calcularon cinco valores de forma: Elipticidad (Fun1: L/An), Rugosidad (Fun2: $4\pi A/P^2$), Elongación (Fun3: $L-An / L + An$), Regularidad (Fun4: $\pi LAn/4A$ y $p2a$ ($P^2/4\pi A$)) (Esteso et al. 2009). El valor de $p2a$ relaciona el perímetro de un objeto con su área (Sailer et al. 1996) considerando un valor mínimo de 1,0 para un círculo. Si esta proporción aumenta, la cabeza de los espermatozoides se diferencia más de la forma de un círculo.

6.4.4 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm EE. Se consideró como unidad experimental al macho, por tanto, las colecciones repetidas de un mismo macho fueron previamente promediadas.

Se realizó una regresión lineal entre los valores morfométricos (L, An, A y P) y la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas. Además se utilizó una regresión lineal para relacionar el tamaño de la cabeza de los espermatozoides del semen de un mismo macho colectado en dos colecciones diferentes, considerando como valor independiente el colectado en la primera extracción.

Los datos morfométricos fueron utilizados para realizar una matriz con el fin de analizar la existencia de subpoblaciones espermáticas. A partir de las muestras obtenidas en los 17 machos, se evaluaron 1700 observaciones de las cabezas de los espermatozoides (100/espermatozoide/frotis analizado). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis

de conglomerados de k-medias para clasificar los factores de tamaño y forma en un número reducido de subpoblaciones en función de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides (Esteso et al. 2009). Éste análisis implica que el operador debe establecer a priori el número de clusters a ser utilizado. Luego de realizar una serie de pruebas preliminares se observó que al utilizar 4 o 5 clusters una de las subpoblaciones estaba comprendida por pocos espermatozoides pertenecientes a los eyaculados de pocos machos, por lo que no era una subpoblación que representará efectivamente al total de los machos evaluados. A su vez, al evaluar con 2 clusters, se encontraron menores diferencias entre las subpoblaciones que al analizar 3 clusters. Por lo tanto, el número final de clusters se fijó en 3. Los parámetros morfométricos fueron comparados mediante ANOVA.

La normalidad de los parámetros morfométricos como el de las variables espermáticas se determinaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks, para luego compararlos con ANOVA.

Se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6.5 Resultados

6.5.1 Espermiograma

El volumen del eyaculado fue $413,9 \pm 51 \mu\text{l}$ (rango: 50 - 1655 μl), con una concentración de $792,2 \pm 96,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL (rango: 55,6 – 1890 $\times 10^6$ espermatozoides/mL) y un número total de espermatozoides en el eyaculado (concentración de espermatozoides X volumen) de $315,8 \pm 54,0 \times 10^6$ (20,1 – 1324,8 $\times 10^6$ espermatozoides). El color del semen varió entre transparente, amarillo o blanco, siendo el pH de $7,5 \pm 0,4$ (rango: 7,0 - 8,5).

La calidad de la motilidad fue de $3,4 \pm 0,2$ (rango: 1,5 - 5,0), el porcentaje de espermatozoides móviles fue de $69,1 \pm 3,2 \%$ (rango: 25 - 90 %) y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue de $59,4 \pm 3,7 \%$ (rango 5 - 90 %). En el 78,8 % y 39,4 % de las muestras, la calidad de la motilidad fue igual o mayor que 3 y 4, respectivamente. Existió un 93,4 % y 63,4 % de las muestras con al menos el 50 % y el 70 % de espermatozoides móviles, respectivamente. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva que fue igual o mayor a 60 %, 70 % y 80 % fue 57,6 %, 39,4 % y 15,1 %, respectivamente.

El porcentaje de espermatozoides con su membrana íntegra perteneciente a las muestras colectadas en 2008 y 2009 (E - N) fue de $80,2 \pm 6,9 \%$ (rango: 72 – 93 %) y las colectadas en 2010 y 2012 (HOS) fue de $90,9 \pm 1,1 \%$ (rango: 85 – 96 %). La incidencia de espermatozoides con anomalías morfológicas se muestra en la Tabla 2. En general, el $63,3 \pm 3,1 \%$ (rango: 20 – 89 %) de los espermatozoides presentaron anomalías morfológicas. Por otra parte, 76,5 % de las muestras tuvieron más del 50 % de sus espermatozoides con anomalías. El porcentaje de espermatozoides con anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola fue de $18,2 \pm 4,1 \%$; $51,7 \pm 4,8 \%$ y $42,5 \pm 3,5 \%$, respectivamente. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue del $30,0 \pm 4,7 \%$, y con acrosoma desprendido fue de $4,3 \pm 0,8 \%$.

Tabla 2. Porcentajes de espermatozoides con anomalías morfológicas de cabeza, pieza media y cola de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) colectado durante la estación reproductiva mediante EE bajo anestesia general (n = 18 machos).

Anormalidad	Media \pm EE (%)	Mediana \pm RSIQ* (%)	Rango (%)
Cabeza			
Macrocefalia	0,3 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	0,0 – 4,2
Microcefalia	0,4 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0	0,0– 3,8
Redonda	1,1 \pm 0,4	0,0 \pm 0,57	0,0 – 9,8
Piriforme	5,0 \pm 1,3	2,3 \pm 2,8	0,0 – 35,8
Elongada	0,5 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,0 – 15,0
Suelta	10,9 \pm 1,9	5,9 \pm 6,3	0,0 – 54,5
Pieza media			
Elongada	0,04 \pm 0,04	0,0 \pm 0,0	0,0 – 1,6
Abaxial	2,8 \pm 0,9	1,1 \pm 1,7	0,0 – 31,2
Afinada	0,09 \pm 0,06	0,0 \pm 0,0	0,0 – 2,5
Gota proximal	27,5 \pm 2,7	21,1 \pm 10,4	2,3 – 72,4
Plegada	7,0 \pm 1,1	4,7 \pm 5,6	0,0 – 25,7
Gota distal	14,3 \pm 1,9	10,4 \pm 9,0	0,0 – 48,0
Cola			
Ovillo	6,3 \pm 1,4	1,7 \pm 4,8	0,0 – 35,9
Corta	0,04 \pm 0,04	0,0 \pm 0,0	0,0 – 1,6
Plegada	18,4 \pm 3,3	9,5 \pm 12,6	0,0 – 75,4
Gancho	5,2 \pm 1,9	0,0 \pm 2,0	0,0 – 64,2

*RSIQ: Rango Semi- InterCuartil

6.5.2 Parámetros morfométricos

Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides (tamaño y forma) se presentan en la Tabla 3. La longitud de la cabeza de los espermatozoides tuvo una relación positiva con la calidad de la motilidad (Figura 2a), con el porcentaje de espermatozoides móviles (Figura 2b), y con el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Figura 2c) (Tabla 4). El área de la cabeza y el perímetro mostraron una relación positiva con la calidad de la motilidad (Tabla 4). Fun1 y Fun3 tendieron a mostrar una relación positiva con el porcentaje de espermatozoides móviles (Tabla 4).

Tabla 3. Parámetros morfométricos (tamaño y forma) de la cabeza de los espermatozoides de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*; n = 17) de muestras colectadas durante la estación reproductiva.

	Media \pm EE	Rango
Valores de tamaño		
Largo (μm)	7,6 \pm 0,01	5,7 – 12,1
Ancho (μm)	4,4 \pm 0,01	3,2 – 6,5
Área (μm^2)	28,1 \pm 0,07	16,8 – 42,0
Perímetro (μm)	21,9 \pm 0,04	16,6 – 40,2
Valores de forma		
Fun1 (Elipticidad)	1,7 \pm 0,005	1,1 – 2,9
Fun2 (Rugosidad)	0,7 \pm 0,001	0,3 – 0,9
Fun3 (Elongación)	0,3 \pm 0,001	0,06 – 0,5
Fun4 (Regularidad)	0,9 \pm 0,001	0,8 – 1,3
p2a	1,4 \pm 0,003	1,1 – 3,1

Valor de la forma p2a considera un mínimo valor de 1,0 para un círculo.

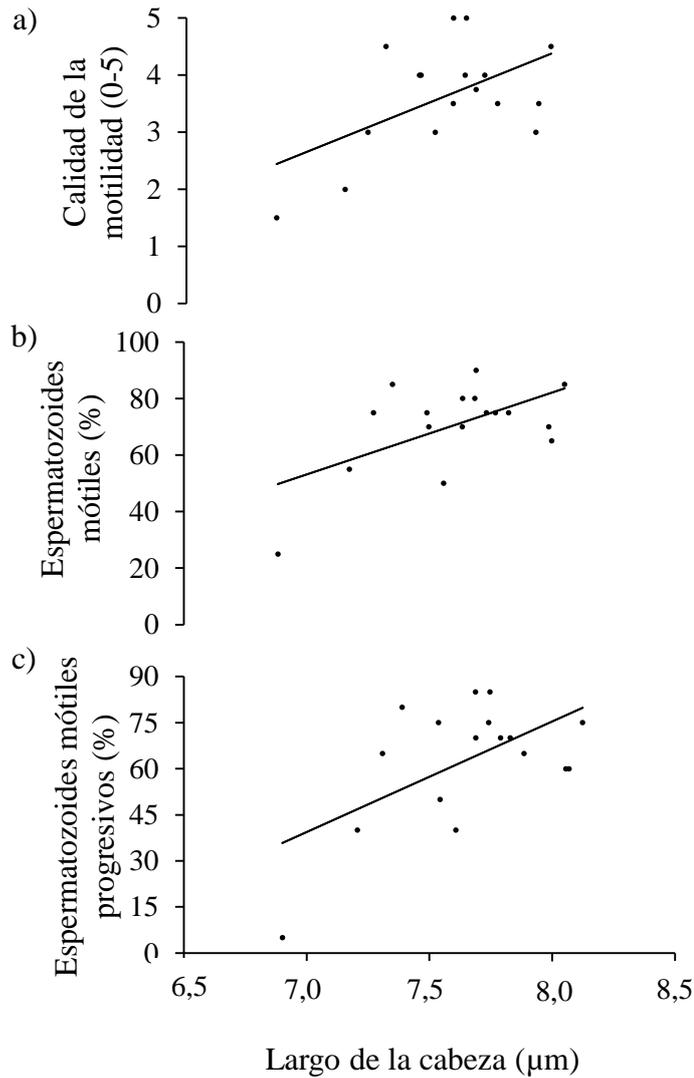


Figura 2. Relación entre la calidad de la motilidad espermática (a), el porcentaje de espermatozoides móviles (b), y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (c) y la longitud de la cabeza de los espermatozoides del semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, n = 17 machos).

Tabla 4. Relación entre los parámetros morfométricos y la calidad de la motilidad (0: inmóviles, 5: alta motilidad), porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*; n = 17 machos).

	Calidad motilidad		Motilidad		Motilidad progresiva		Anormalidades	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Largo	0,54	0,03	0,54	0,03	0,53	0,03	0,03	ns
Ancho	0,10	ns	0,11	ns	0,05	ns	0,14	ns
Área	0,50	0,04	0,33	ns	0,37	ns	0,02	ns
Perímetro	0,50	0,05	0,38	ns	0,41	ns	0,14	ns
Fun1(Elipticidad)	0,24	ns	0,42	0,09	0,36	ns	0,10	ns
Fun2 (Rugosidad)	0,24	ns	0,29	ns	0,27	ns	0,23	ns
Fun3 (Elongación)	0,29	ns	0,46	0,06	0,41	ns	0,10	ns
Fun4 (Regularida)	0,27	ns	0,27	ns	0,26	ns	0,31	ns

Hubo una relación positiva entre los parámetros morfométricos registrados en la primera y segunda colección realizadas a los mismos machos: longitud (R = 0,79; p = 0,011), ancho (R = 0,86; p = 0,003), área (R = 0,83; p = 0,006) y perímetro (R = 0,59; p = 0,009).

6.5.3 Subpoblaciones espermáticas

Se identificaron tres subpoblación de espermatozoides (Tabla 5), las cuales se dividieron según sus características en:

- Subpoblación 1 (SP1): se caracterizó por espermatozoides con los mayores valores del tamaño de la cabeza y con los valores más altos de p2a. Incluye el $18,2 \pm 1,0$ % de los espermatozoides evaluados (rango: 0 - 52 %). Sólo un macho tenía más de 50 % del total de los espermatozoides en su eyaculado en SP1.
- Subpoblación 2 (SP2): incluyó los espermatozoides que presentaron valores intermedios entre SP1 y SP3. Correspondió al $45,2 \pm 0,6$ % (rango: 4 - 70 %) de los

espermatozoides evaluados. Siete de los 17 machos evaluados (41,2 %) tenían más de 50 % de los espermatozoides pertenecientes a SP2.

- Subpoblación 3 (SP3): incluyó los espermatozoides con la dimensión de la cabeza más pequeño, y correspondió al $36,6 \pm 1,1$ % (rango: 1 - 95 %) de los espermatozoides totales. Cuatro machos del total tenían más de 50 % de sus espermatozoides en SP3.

Tabla 5. Parámetros morfométricos de las subpoblaciones de las cabezas de los espermatozoides obtenidas a través de un análisis de cluster (media \pm EE) (n = 17).

Parámetros morfométricos	Subpoblación espermática		
	SP1	SP2	SP3
Largo (μm)	$8,19 \pm 0,03^a$	$7,77 \pm 0,01^b$	$7,24 \pm 0,02^c$
Ancho (μm)	$4,75 \pm 0,02^a$	$4,44 \pm 0,01^b$	$4,16 \pm 0,01^c$
Área (μm^2)	$32,41 \pm 0,09^a$	$28,86 \pm 0,04^b$	$25,16 \pm 0,06^c$
Perímetro (μm)	$24,07 \pm 0,09^a$	$22,25 \pm 0,03^b$	$20,52 \pm 0,04^c$
Fun1 (Elipticidad)	$1,73 \pm 0,01$	$1,76 \pm 0,007$	$1,75 \pm 0,008$
Fun2 (Rugosidad)	$0,71 \pm 0,004^a$	$0,73 \pm 0,002^b$	$0,75 \pm 0,002^c$
Fun3 (Elongación)	$0,26 \pm 0,003$	$0,27 \pm 0,002$	$0,27 \pm 0,002$
Fun4 (Regularidad)	$0,94 \pm 0,003$	$0,94 \pm 0,002$	$0,94 \pm 0,002$
p2a	$1,43 \pm 0,01^a$	$1,37 \pm 0,004^b$	$1,34 \pm 0,004^c$

Valor de forma p2a considera un valor mínimo de 1,0 para un círculo.

^{a,b,c} Valores con diferentes superíndices en la misma fila son significativamente diferentes ($p < 0,001$).

6.6 Discusión

Esta es la primera descripción de las características del semen de venado de campo colectadas por EE durante la estación reproductiva. Los parámetros del espermiograma variaron entre los machos y las colecciones, por lo que es difícil comparar los resultados con los datos preliminares reportados en esta especie (Duarte et al. 1993; Ungerfeld et al. 2008). Esta amplia variación pudo estar relacionada con las condiciones en que se obtuvieron las muestras seminales: animales que se encontraban estresados, ya que fueron capturados con dardos anestésicos, mantenidos bajo anestesia general, además de que se les realizó EE. Dichos procedimientos pueden producir una amplia variabilidad en las características del semen (Memon et al. 1986), además de ser muy estresantes para los animales (Fumagalli et al. 2012). Hasta el momento es la única técnica disponible para coelctar semen en esta especie, por lo que la baja concentración, el volumen y la calidad espermática obtenida podrían llegar a ser una limitante para su criopreservación. Si bien en algunos casos se podría utilizar las muestras colectadas para su criopreservación, dado los bajos valores obtenidos de concentración y volumen, las mismas producirían un número reducido de pajuelas conteniendo una baja concentración de espermatozoides. Producir pajuelas de baja concentración espermática puede ser de utilidad para las primeras instancias de evaluación de los procesos de congelación-descongelación, pero no para implementar en un futuro biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial. Para tener éxito al realizar inseminaciones, se deberá reducir aún más la cantidad de pajuelas que se puedan obtener de cada macho con el fin de concentrar un número mayor de espermatozoides en cada una.

La calidad de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles se encontraron en el mismo rango de los obtenidos en otras especies de ciervo (Gosch et al. 1989; de Abreu et al. 2009). Asimismo, se encontró una alta variabilidad en el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas, tanto en la forma de la cabeza como en el tamaño de los espermatozoides, como ocurre en otras especies (Giuliano et al. 2008). Se encontró un alto porcentaje de espermatozoides con anomalías, principalmente en el porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales y proximales (residuos citoplasmáticos). A su vez, en humanos se ha relacionado la presencia de gota citoplasmática con una elevada concentración de creatina quinasa en el semen (Durutovic et al. 2013), la concentración sérica de dicha enzima aumentó en el venado de campo durante el proceso de EE (Fumagalli et al. 2012).

Chandler et al. (1988) y Keating et al. (1997) vincularon los porcentajes altos de dichas anomalías con una disminución en la tasa de fertilidad. El exceso de residuos citoplasmáticos sugiere que estos espermatozoides son todavía inmaduros, y como consecuencia podrían tener una mala función en cuanto a la fertilidad (Keating et al. 1997). En otras especies de ciervo también se observó una proporción alta de espermatozoides con estas anomalías (ver revisión: Drion et al. 2003; Gosch et al. 1989), por lo que se sugiere que este puede ser un patrón general en los eyaculados de algunos cérvidos. El alto porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas (proximal y distal) y con anomalías morfológicas de la cola podría estar explicando la baja motilidad y la alta viabilidad que se observó en las muestras evaluadas. Dado que el flagelo es la parte más compleja de los espermatozoides, compuesto de una gran cantidad de estructuras y de componentes que funcionan de forma dependiente entre sí, los defectos en cualquiera de los componentes tienen efectos negativos sobre la motilidad (Barth & Oko, 1989). A su vez, dado que estos venados no tenían acceso a hembras, el alto porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado puede estar relacionado con el período de reposo sexual de estos animales, como ha sido reportado en toros (Wells et al. 1970ab). Destacar nuevamente que el alto porcentaje de anomalías podría deberse no solo al estrés que sufrieron los animales durante el proceso de captura, anestesia y por el proceso de colección seminal, sino que también estos animales podrían poseer cierto nivel de estrés no solo por ser especies salvajes sino por el ambiente en el cual se encuentran lo que podría estar afectando las características seminales de los machos. Sin embargo, también debe considerarse que la población de la ECFA se originó a partir de dos capturas realizadas en la población ubicada en Salto, por lo que la homocigosis podría ser una posible fuente de la baja calidad espermática (Baccetti et al. 2001, Morato et al. 2001), provocando una disminución en el éxito reproductivo (Araki et al. 2007). Sin embargo, no se pudo determinar la causa exacta de la baja calidad seminal que presenta el venado de campo. Será necesario desarrollar nuevos estudios para determinar si la causa de la baja calidad del semen es consecuencia del manejo en cautiverio que poseen estos animales o bien es la calidad normal del semen de venado de campo.

Se describieron los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de muestras seminales colectadas mediante EE. En otras especies de cérvidos se han determinado datos de los parámetros morfométricos de los espermatozoides que fueron colectados a partir de epidídimo y diluidas en un diluyente (Malo et al. 2006; Estes et al. 2009), o en muestras criopreservadas (Estes et al. 2006). La longitud de la cabeza de los espermatozoides fue más pequeña y el ancho fue similar a la obtenida a partir de las cabezas

de los espermatozoides de ciervo gamo con microscopía electrónica (Gosch et al. 1989), y de ciervo rojo utilizando CASA (Esteso et al. 2009), así como los reportados en carnero (Maroto-Morales et al. 2010), toro (Gravance et al. 2009) y chivos (Hidalgo et al. 2006). Dado que todos estos parámetros varían dentro de los mamíferos (Cummins & Woodall, 1985), en base a esta información se sugiere que se debe conocer más sobre la especie en estudio y evitar la extrapolación directa de los resultados obtenidos en especies productivas como se hace habitualmente.

Se encontró una relación positiva entre los parámetros morfométricos y la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides mótils y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Del mismo modo, Malo et al. (2006) y Ramón et al. (2013) en ciervo rojo encontraron una relación positiva entre la longitud de la cabeza y la velocidad de los espermatozoides: aquellos espermatozoides con cabezas alargadas poseen una mayor velocidad en su motilidad. Dichos resultados también son similares a lo encontrado por Gomendio & Roldan (1991) quienes evaluaron la influencia del tamaño de los espermatozoides en la competición espermática en mamíferos. Sin embargo, Gil et al. (2009) observaron una relación negativa entre la longitud de la cabeza y la motilidad lineal y progresiva en semen de cerdo. Dado los datos contradictorios encontrados en la literatura y los bajos valores del coeficiente de correlación determinado en esta y en la mayor parte de los trabajos, las relaciones encontradas entre la motilidad y los parámetros morfométricos deben ser considerados con cautela. Por otro lado, es interesante que los parámetros morfométricos determinados en los mismos machos en dos colecciones diferentes se encuentren estrechamente relacionados. Esta información sugiere que el tamaño de la cabeza de los espermatozoides de los machos de venado de campo es estable, y puede que este patrón persista durante la vida reproductiva del animal. De ser así, esta información podría ser útil para elegir los mejores machos desde el punto de vista seminal, y mejorar el uso de biotecnologías reproductivas.

Vicente-Fiel et al. (2013) describieron la existencia de subpoblaciones espermáticas en el ganado bovino, caprino, ovino y porcino, encontrando una gran heterogeneidad entre especies, así como entre machos de una misma especie. De manera similar a lo que se ha observado en otras especies (Esteso et al. 2009), se determinó la existencia de 3 subpoblaciones espermáticas diferentes (SP1: espermatozoides grandes, SP2: espermatozoides intermedios y SP3: espermatozoides pequeños). La existencia de subpoblaciones espermáticas reafirma la idea de la heterogeneidad existente en los eyaculados de los mamíferos, mostrando diferentes respuestas hacia estímulos bioquímicos

(Buffone et al. 2004), funcionales (Martínez-Pastor et al. 2005), diferentes patrones de motilidad (Quintero-Moreno et al, 2003; Núñez -Martínez et al, 2006), e incluso con diferentes parámetros morfométricos (Thurston et al, 1999; Peña et al, 2005). El estudio de subpoblaciones de espermatozoides en un eyaculado podría ser una herramienta práctica para predecir la resistencia de los espermatozoides a los procesos de criopreservación (Quintero-Moreno et al, 2003; Núñez-Martínez et al, 2006), ya que en varios estudios han encontrado una relación negativa entre el tamaño de la cabeza de los espermatozoides y la preservación de los mismos (Thurston et al. 2001; Peña et al. 2005; Estes et al. 2006). Según la información previa, y dada la existencia de un gran número de espermatozoides pertenecientes a las subpoblaciones SP2 y SP3 se podría especular que estos espermatozoides se preservarían mejor que los SP1 durante un proceso de criopreservación. Sin embargo, debido al bajo volumen de semen de algunas de las muestras, sólo fue posible evaluar el semen fresco y no se pudieron realizar estudios de preservación. Se necesita realizar nuevas investigaciones utilizando semen fresco y descongelado para identificar las posibles relaciones entre las subpoblaciones espermáticas y la crioresistencia en venado de campo. Dado que los parámetros morfométricos permiten evaluar la existencia de subpoblaciones espermáticas y éstos últimos se pueden vincular con la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación, sería recomendable incluir en futuras colecciones la evaluación de estos parámetros como parte del espermiograma básico.

6.7 Conclusiones

- Se caracterizó el espermiograma básico del semen de venado de campo de muestras coelctadas durante la estación reproductiva, el que presentó baja concentración, volumen, calidad global y alto porcentaje de anormalidades morfológicas, lo que puede ser una limitante para su criopreservación.
- En base a la descripción de los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides, un dato importante para incluir como parte del espermiograma básico, se determinó la existencia de 3 subpoblaciones espermáticas con diferentes características morfométricas.
- Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides fueron similares entre diferentes colecciones.

7. CAPÍTULO II: COMPARACIÓN DE DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE VENADO DE CAMPO

7.1 Introducción

Hasta el momento se han evaluado varias técnicas de preservación de semen en varias especies productivas, incluyendo la comparación de diluyentes y métodos de procesamientos específicos. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado con el fin de criopreservar semen de especies de cérvidos que están en peligro de extinción. Los datos colectados en especies productivas son de suma utilidad, para comenzar a implementar biotecnologías que preserven semen de dichas especies. Sin embargo, dado que los diluyentes son especie-específico, es necesario testear diluyentes, partiendo de datos determinados en otras especies, pero con el fin de evaluar cómo adaptarlos adecuadamente para la especie en estudio. La mayoría de los diluyentes utilizados en cérvidos han sido adaptados de diluyentes en base a Tris y/o citrato, adicionados con yema de huevo para proteger a los espermatozoides de los cambios bruscos de temperatura y con glicerol como crioprotector (Asher et al. 2000). La efectividad de la protección de los espermatozoides durante la criopreservación puede estar influenciada por el procedimiento de colección seminal utilizado (Martínez-Pastor et al. 2006), por la proporción de glicerol utilizada en el diluyente, así como por el resto de los componentes que forman el diluyente y la interacción entre ellos (Cheng et al. 2004).

La ventaja de utilizar diluyentes comerciales es que los componentes utilizados entre diferentes colecciones están estandarizados. Andromed (sin adición de yema de huevo) y Triladyl (adicionado con 20 % yema de huevo) son diluyentes comerciales utilizados para criopreservar semen en varias especies (Haigh et al. 1993; Garde et al. 2003; Zomborszky et al. 2005; Martínez-Pastor et al. 2009). El diluyente Andromed no necesita la adición de yema de huevo, lo que disminuye la posibilidad de transmitir enfermedades, y al ser transparente permite una mejor visualización de la muestra en el microscopio. Por estos motivos su utilización es recomendada por algunos investigadores (de Ruigh et al. 2006; Martínez-Pastor et al. 2009).

Se ha criopreservado satisfactoriamente muestras seminales colectadas mediante EE en varias especies de cérvidos, como el ciervo cola blanca (Jacobson et al. 1989), ciervo rojo (Martínez-Pastor et al. 2006) y ciervo axis (Umaphaty et al. 2007; Haigh et al. 1993) en base a Tris, yema de huevo y glicerol. Dicha composición es similar a la del diluyente comercial

Triladyl. Haigh et al. (1993) en ciervo axis obtuvieron una motilidad espermática promedio de 31 % luego de la descongelación al utilizar el diluyente Triladyl. Sin embargo en ciervo rojo se obtuvo cerca de 50% de espermatozoides móviles, tanto al utilizar el diluyente Triladyl como el Andromed (Martínez-Pastor et al. 2009). Los resultados en ciervo rojo abren la posibilidad de criopreservar efectivamente muestras seminales de cérvidos sin necesidad de adicionar yema de huevo al diluyente.

La fructosa es un monosacárido que ha demostrado ser beneficioso para criopreservar los espermatozoides en varias especies: toro (García & Graham, 1989), carnero (Abdelhakeam et al. 1991), ciervo ibérico (Fernández-Santos et al. 2007) y perro (Woelders et al. 1997). La fructosa está presente en los diluyentes comerciales Triladyl y Andromed. Khalili et al. (2010) demostraron que el semen criopreservado de carneros mejoró la motilidad espermática, así como la viabilidad y la integridad tanto del acrosoma como de la membrana del espermatozoide al adicionarle glicina al diluyente. A raíz de estos hallazgos, Fernández et al. (2013) evaluaron la criopreservación de semen de ciervo gamo con un diluyente casero en base a Tris, fructosa, 20 % de yema de huevo, con la adición de glicina (FTG) o sin la adición de glicina (FT). Los autores reportaron que las muestras diluidas con FTG presentaron mejores valores de motilidad y de integridad de membrana que las preservadas con FT luego de la descongelación.

De acuerdo a la información previamente mencionada, se planteó testear la efectividad de utilizar los diluyentes Andromed o Triladyl, además de un diluyente FTG con 10 % o 20 % de yema de huevo, a partir de muestras de semen de venado de campo.

7.2 Objetivo

Comparar la efectividad de diferentes diluyentes para la criopreservación de muestras seminales de venado de campo colectadas mediante EE (*Ozotoceros bezoarticus*) durante diferentes estaciones del año.

7.3 Materiales y métodos generales

El presente trabajo constó de 2 experimentos:

- Experimento 1 corresponde a muestras colectadas durante de la estación reproductiva (febrero-marzo) diluidas con 2 diluyentes comerciales.
- Experimento 2 corresponde a muestras colectadas fuera de la estación reproductiva (setiembre-noviembre) diluidas con un diluyente casero con 2 proporciones distintas de yema de huevo.

Se explicarán los materiales y métodos generales para ambos experimentos y luego en los materiales y métodos de cada experimento la metodología específica de cada uno.

7.3.1 Nomenclatura de las muestras

Para una mejor comprensión de los procedimientos realizados, se denominó T_0 a las evaluaciones de las muestras del semen recién colectado (en fresco y fijadas), T_1 a las muestras inmediatamente luego de completar la dilución en cada uno de los diluyentes, T_2 a las muestras luego del enfriado a 5°C , T_3 a las muestras luego de la descongelación, T_4 luego de una hora posdescongelación y T_5 a 2 h posdescongelación.

7.3.2 Congelación

7.3.2.1 Evaluación seminal general

Una vez colectado, el semen se colocó en baño maría a 37°C . En T_0 se evaluaron todos los parámetros del espermograma básico (al igual que en las muestras evaluadas para la caracterización espermática), y en T_1 y T_2 se determinó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. A su vez en T_0 y T_2 se determinó la integridad de membrana mediante la técnica de HOS, y se realizaron fijaciones para determinar el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas y la integridad del acrosoma.

7.3.2.2 Refrigeración y congelación general

Una vez que se realizaron todas las evaluaciones y fijaciones en T_0 , y si el volumen era suficiente para congelar, se procedió a realizar la dilución en forma progresiva del semen (T_1). Luego de obtener la dilución final requerida en cada uno de los experimentos, se depositaron 50 μl en un microtubo (eppendorf, 1,5 cc) para realizar las evaluaciones posteriores (T_1 y T_2), y el resto del volumen se utilizó para envasar en pajuelas. Luego que las pajuelas fueron selladas con alcohol polivinílico se las colocó junto con el microtubo (muestra a evaluar) en un recipiente con agua (1000 cc aproximadamente a temperatura ambiente) que fue colocado en un freezer ($-10\text{ }^\circ\text{C}$) durante aproximadamente 90 min, hasta llegar a una temperatura de $5\text{ }^\circ\text{C}$ (T_2). Cuando se llegó a dicha temperatura se evaluaron las muestras que estaban en los microtubos, y se dejó a las pajuelas equilibrando durante 2 h a $5\text{ }^\circ\text{C}$. Luego las pajuelas se colocaron en una rampa horizontal a vapores estáticos de nitrógeno (4 a 6 cm del nivel de nitrógeno) durante 10 minutos (aproximadamente $-120\text{ }^\circ\text{C}$), para posteriormente sumergirlas en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^\circ\text{C}$), y conservarlas en el tanque de nitrógeno, hasta su posterior evaluación posdescongelación.

7.3.3 Descongelación

Luego de algunos meses (6 – 8 meses) las muestras se descongelaron, y se evaluó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva al momento de la descongelación: 0 (T_3), a la hora (T_4) y a las 2h (T_5) posdescongelación.

Las pajuelas fueron descongeladas manteniéndolas durante 10 s a temperatura ambiente para luego introducirlas en un baño a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 s (Renard & Babinet, 1984). Inmediatamente se cortó el extremo sellado con alcohol polivinílico, liberando el semen en un microtubo (eppendorf, 1,5 cc) atemperado a $37\text{ }^\circ\text{C}$, cortando el otro extremo por debajo del algodón. En T_3 y T_5 se fijaron muestras para evaluar el porcentaje de espermatozoides con anormalidades y la integridad del acrosoma de los mismos. A su vez en T_3 se realizó la técnica de HOS.

7.3.4 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm EE. Los datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas, tomando como tratamientos los diluyentes, determinando la influencia del momento de evaluación (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅), así como sus respectivas interacciones.

7.4 Experimento 1

7.4.1 Objetivo

Comparar el resultado de criopreservar semen colectado durante la estación reproductiva diluido con Andromed o con Triladyl.

7.4.2 Materiales y métodos

7.4.2.1 *Animales*

Se utilizaron muestras seminales colectadas de 11 machos durante la estación reproductiva (febrero- abril). Dado que no se pudo colectar semen de un animal, se trabajó con eyaculados de 10 machos.

7.4.2.2 *Diluyentes utilizados*

Las muestras fueron diluidas con 2 diluyentes comerciales: Andromed o Triladyl. Andromed es un diluyente que no posee yema de huevo; al Triladyl se le debe adicionar 20 % de yema de huevo antes de ser utilizado.

7.4.3 Resultados

El amplio rango del volumen espermático (50,0 – 1785,0 μl ; media: $577,0 \pm 148,08 \mu\text{l}$) así como la concentración de los eyaculados (100,0 – 1890,0 $\times 10^6$ espermatozoides/mL; media: $636,1 \pm 195,6 \times 10^6$ espermatozoides/mL) del semen de venado de campo impidieron congelar varias pajuelas de un mismo macho, por lo que las mismas fueron envasadas con bajas concentraciones espermáticas (10,0 – 70,0 $\times 10^6$ espermatozoides por pajuela).

7.4.3.1 *Calidad de la motilidad y motilidad espermática*

El diluyente Triladyl protegió mejor que Andromed la motilidad espermática ($p = 0,05$; Figura 3b) y tendió a ser mejor en la protección de la calidad de la motilidad ($p = 0,10$; Figura

3a), y en la motilidad progresiva de los espermatozoides ($p = 0,07$; Figura 3c). No hubo interacción entre el tratamiento y el momento en que se realizaron las evaluaciones en las 3 variables mencionadas, pero todos los parámetros disminuyeron a lo largo del proceso de evaluación ($p < 0,0001$; Figura 3).

7.4.3.2 Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosómica

No hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides anormales, ni en la integridad del acrosoma de los espermatozoides entre los diluyentes. Tampoco hubo una interacción entre el tratamiento y el momento en que se realizó cada evaluación en estas variables. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides anormales aumentó entre T_2 y T_3 ($p < 0,0001$, Figura 4a) y el porcentaje de espermatozoides con su acrosoma íntegro disminuyó durante el proceso de criopreservación ($p < 0,01$; Figura 4b). Por último se observó que las muestras diluidas con Triladyl tendieron a proteger mejor la integridad de membrana de los espermatozoides ($p = 0,09$), disminuyendo en los diferentes momentos de evaluación ($p < 0,0001$, Figura 5). Sin embargo, no se encontró interacción entre el tratamiento utilizado y el momento en que se realizó la evaluación.

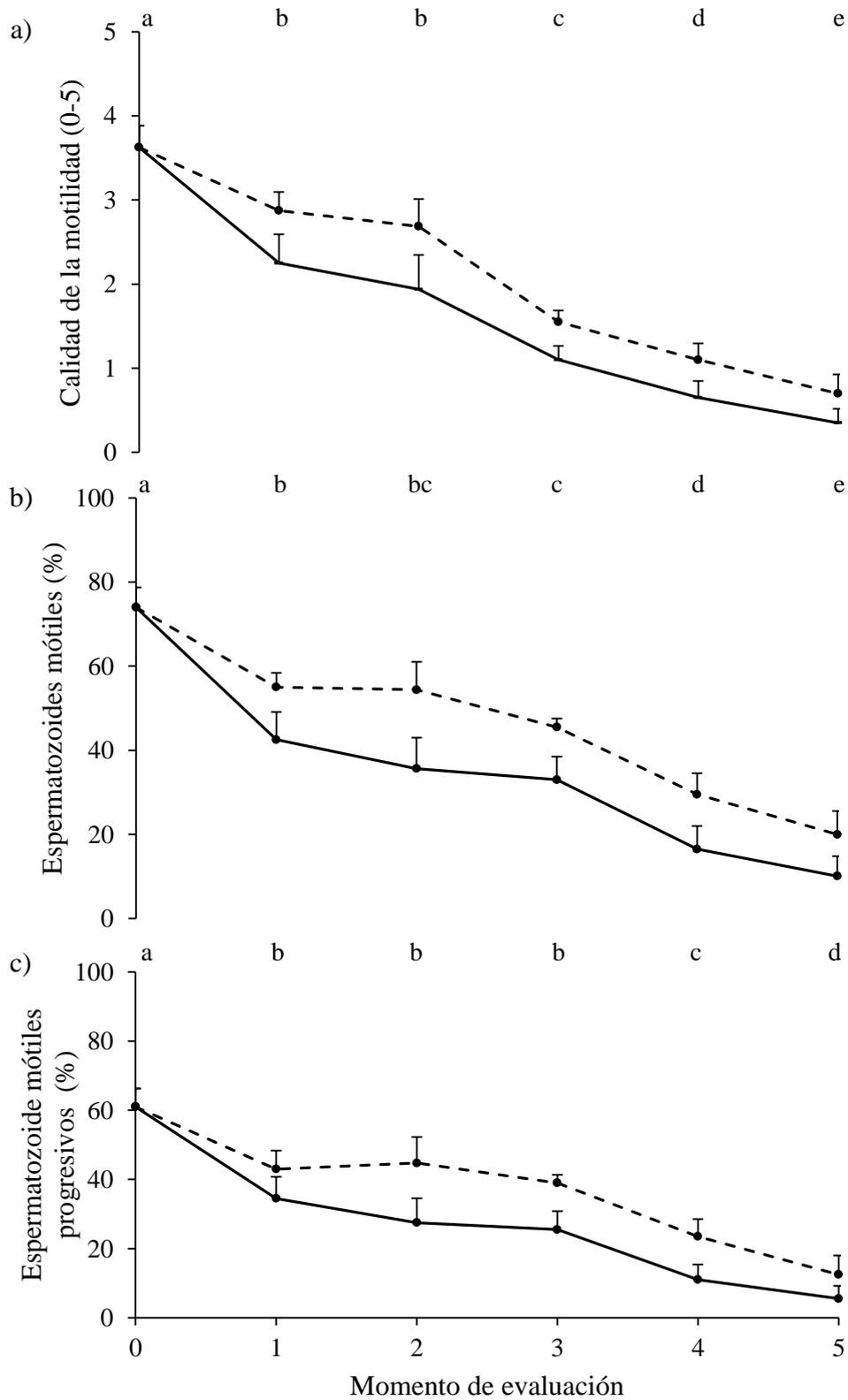


Figura 3. Calidad de la motilidad (a), porcentaje de espermatozoides mótiles (b) y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (c) de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) colectado durante la estación reproductiva y diluidos con Andromed (-) o Triladyl (--) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1: luego de la adición

del diluyente; 2: 5 °C; 3: posdescongelación; 4: 1 h posdescongelación; 5: 2 h posdescongelación).

Diferentes letras: $P < 0,05$.

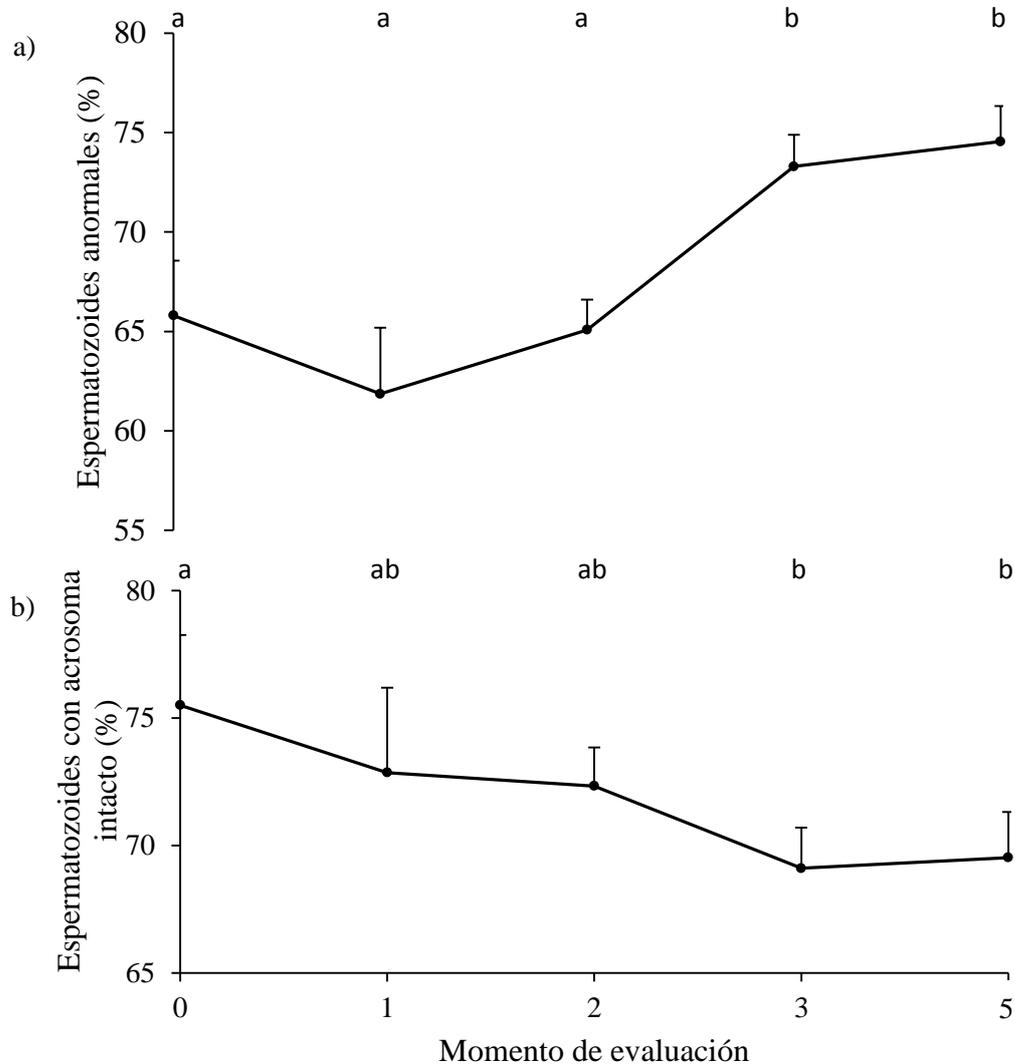


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (a) y porcentaje de espermatozoides con su acrosoma íntegro (b) de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). El semen fue colectado durante la estación reproductiva y diluidos con Andromed o Triladyl. Los datos se presentan agrupados (no existen diferencias significativas entre los diluyentes utilizados) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1: luego de la adición del diluyente; 2: 5 °C; 3: posdescongelación; 5: 2 h posdescongelación). Diferentes letras: $P < 0,05$.

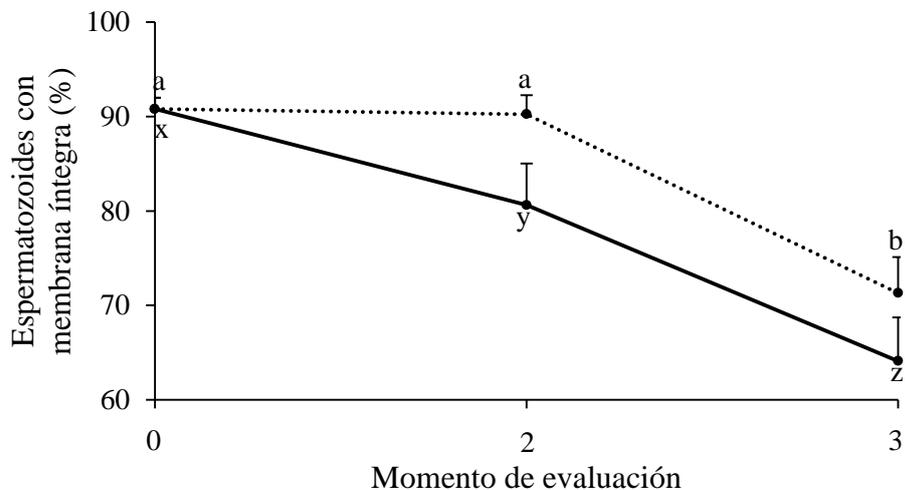


Figura 5. Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) colectado durante la estación reproductiva, y diluidos con Andromed (-) o Triladyl (--) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 2: 5 °C; 3: posdescongelación).

Diferentes letras: $P < 0,05$.

7.5 Experimento 2

7.5.1 Objetivo

- Comparar la efectividad del diluyente FTG adicionado con 10 % o con 20 % de yema de huevo para la preservación de semen colectado fuera de la estación reproductiva.

7.5.2 Materiales y métodos

7.5.2.1 Animales

El trabajo se realizó con muestras seminales colectadas de 16 machos durante la estación no reproductiva (setiembre - noviembre). De estas muestras, se logró criopreservar 10, ya que en 5 de los casos el volumen no fue suficiente para realizar las evaluaciones y congelar, y de otro macho no se obtuvo semen.

7.5.2.2 Diluyente utilizado

Las muestras seminales fueron diluidas con FTG adicionado con 10 % o 20 % de yema de huevo.

7.5.3 Resultados

El total de espermatozoides por pajuela varió ($10,0 - 60,0 \times 10^6$ espermatozoides por pajuela) dependiendo del volumen (rango: $90,0 - 565,0 \mu\text{l}$; media: $213,0 \pm 43,5$) y de la concentración espermática (rango: $10,0 - 935,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL; media: $311,7 \pm 49,9$ espermatozoides/mL) de los eyaculados de cada macho.

7.5.3.1 Calidad de la motilidad y motilidad espermática

La calidad de la motilidad ($2,7 \pm 0,2$) así como el porcentaje de espermatozoides móviles ($47,0 \pm 5,8 \%$) y con motilidad progresiva ($33,0 \pm 4,9 \%$) de las muestras frescas coelctadas fuera de la estación reproductiva fueron numéricamente bajas. La adición de 10 % o de 20% de yema de huevo no afectó la calidad de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides móviles, ni el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Tampoco hubo interacción entre los tratamientos y el momento de evaluación, pero se observó una disminución de las 3 variables a lo largo de los diferentes momentos de evaluación ($p < 0,0001$; Figura 6).

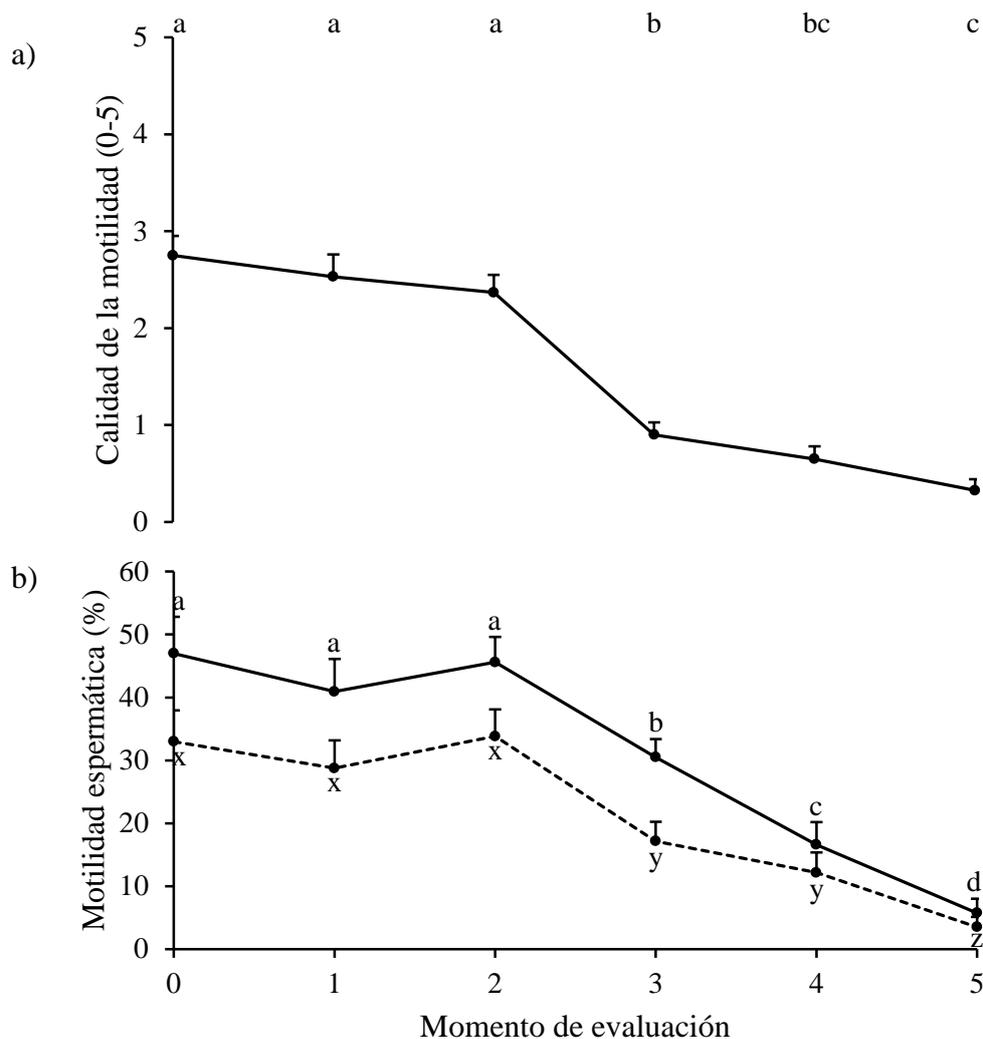


Figura 6. Calidad de la motilidad (a), porcentaje de espermatozoides móviles (b, línea continua) y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (b, línea punteada) de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) colectado durante la estación no reproductiva y diluidos con FTG. Los datos se presentan agrupados (no existen diferencias significativas entre los diluyentes utilizados) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1: luego de la adición del diluyente; 2: 5 °C; 3: posdescongelación; 4: 1 h posdescongelación; 5: 2 h posdescongelación).

Diferentes letras: $P < 0,05$.

7.5.3.2 Anormalidades morfológicas e integridad de membrana y acrosómica

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos al analizar el porcentaje de espermatozoides anormales, ni interacción entre tratamientos y momento de evaluación, encontrando diferencias al transcurrir el tiempo de evaluación ($p = 0,01$; Figura 7a). No hubo diferencias significativas entre tratamientos al analizar el porcentaje de espermatozoides con su membrana íntegra. Tampoco hubo diferencias de acuerdo al momento en que se realizó la evaluación, ni hubo interacción entre tratamientos y momento de evaluación. Tampoco se encontró diferencia en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro entre tratamientos, ni interacción con el momento de evaluación, aunque esta variable disminuyó durante el proceso de congelación-descongelación ($p < 0,0001$; Figura 7b).

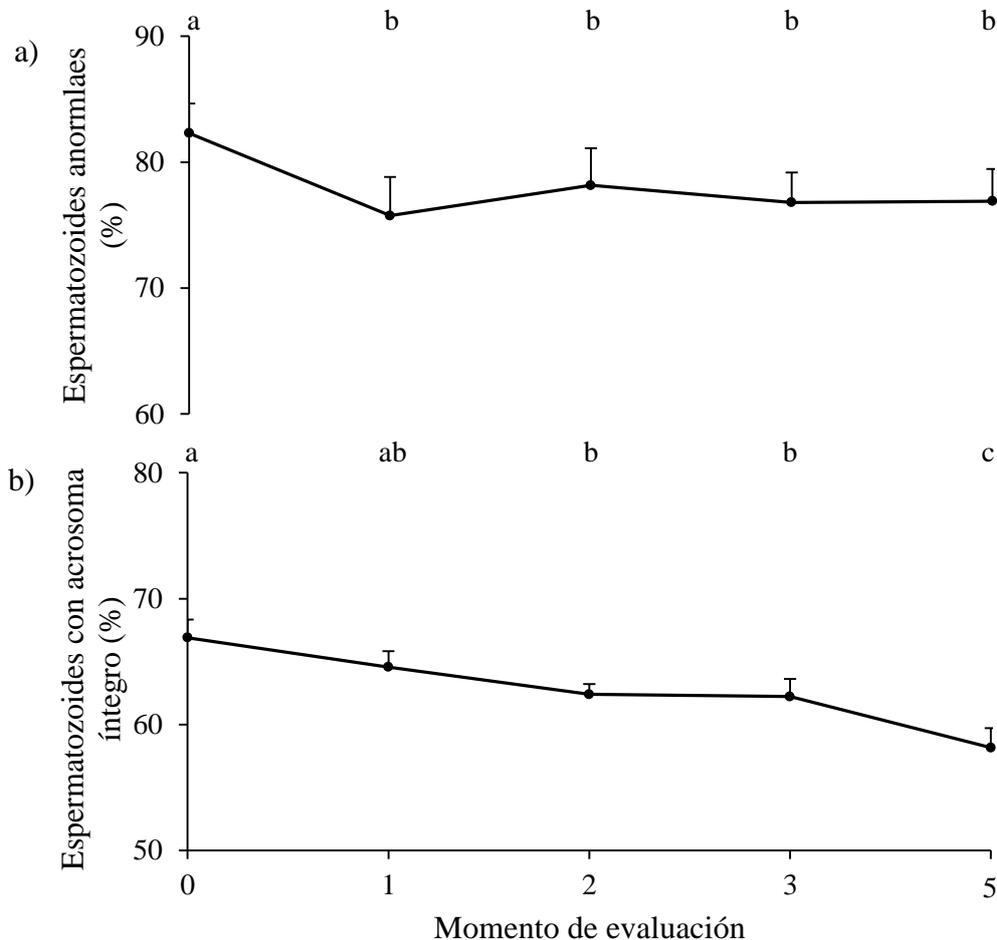


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides con anormalidades morfológicas (a) y porcentaje de espermatozoides con su acrosoma íntegro (b) de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). El semen fue colectado durante la estación no reproductiva y diluidos con FTG.

Los datos se presentan agrupados (no existen diferencias significativas entre los diluyentes utilizados) en función del momento de evaluación (0: semen fresco; 1: luego de la adición del diluyente; 2: 5 °C; 3: posdescongelación; 5: 2 h posdescongelación).

Diferentes letras: $P < 0,05$.

7.6 Discusión: Experimentos 1 y 2

Si bien el bajo volumen y concentración espermática que presentaron los eyaculados de venado de campo no fueron un inconveniente para los objetivos de esta tesis, la baja cantidad de pajuelas con baja concentración de espermatozoides sí puede ser una limitante para generar un banco de semen e implementar técnicas de inseminación artificial con semen congelado. Aunque la información publicada con anterioridad es muy escasa (Duarte et al. 1993; Ungerfeld et al. 2008), la misma es coincidente en cuanto a la baja cantidad de espermatozoides que se logra colectar en la especie. De todas formas, y dado que no se ha colectado semen por otras técnicas o de animales posmortem, no es posible saber si esto es una limitante de la especie o de la técnica de colección. Es importante recordar que la aplicación de anestesia general, sumado al estrés que genera la aplicación de la misma a los animales (Fumagalli et al. 2012) pueden afectar los resultados de la colección seminal.

Los espermatozoides preservados con Triladyl presentaron mejor motilidad y tendieron a preservar mejor la integridad de membranas que los diluidos con Andromed. Dicha diferencia puede deberse a la adición de yema de huevo, ya que en varios estudios se ha observado que la presencia de yema de huevo no sólo protege a los espermatozoides durante la criopreservación (Watson, 1981; Aboagla & Terada, 2004), sino que también protege la motilidad (Holt et al. 1988). Si bien la motilidad resultó mejor con el uso de Triladyl que de Andromed, los valores posdescongelación fueron similares a los encontrados por Martínez-Pastor et al. (2009) en ciervo rojo, quienes consideran que los espermatozoides de ciervo rojo se criopreservaron adecuadamente al utilizar cualquiera de estos dos como diluyentes. Sin embargo, los bajos valores de supervivencia obtenidos luego de la incubación posdescongelación podrían ser un indicador de la baja fertilidad de los espermatozoides, aunque Vianna et al. (2009) no encontraron una relación entre la supervivencia y la fertilidad en los espermatozoides que fueron incubados a diferentes temperaturas y tiempos.

La composición de Andromed y de Triladyl difiere no solo en la adición de yema de huevo, sino también en el porcentaje de glicerol (7 % y 6 %, respectivamente), así como en

otros compuestos no declarados por el fabricante, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Si bien en la presente tesis no se evaluó un mismo diluyente con diferentes concentraciones de glicerol, dado que en ciervo rojo (Martínez-Pastor et al. 2006) se han obtenido buenos resultados con concentraciones de 4 % a 8 %, es posible que el semen de venado de campo soporte las concentraciones de glicerol utilizadas. De todas formas Cheng et al. (2004) consideran que las diferencias en la crioresistencia de los espermatozoides no serían sólo por la concentración de glicerol, sino que podría ser modulada por varios componentes del diluyente. Por tanto, sería necesario analizar diluyentes de composición conocida variando algunos componentes con el fin de determinar si existe un diluyente que criopreserve mejor que Triladyl los espermatozoides de venado de campo.

La adición de 10 % o de 20 % de yema de huevo a las muestras diluidas con FTG no generó diferencias, pero además, considerando los bajos resultados obtenidos luego de la descongelación, no se recomienda la utilización de semen colectado y procesado de esta forma. En trabajos anteriores también se observó un bajo resultado posdescongelación en muestras criopreservadas fuera de la estación reproductiva (Beracochea, 2012). Por el contrario, en venado de campo (Beracochea, 2012) y en gamo (Fernández et al. 2013), se obtuvieron buenos resultados al criopreservar muestras colectadas durante la estación reproductiva diluidas con FTG con 10 % o con 20 % de yema de huevo, respectivamente. Por tanto, las características del semen colectado fuera de la estación reproductiva parecen ser una limitante importante, que por tanto dificulta evaluar adecuadamente el diluyente utilizado. Los bajos valores seminales encontrados fuera de la estación reproductiva pueden estar afectados por la composición del plasma seminal, la que en otros pequeños rumiantes varía estacionalmente (ver revisión: Muiño-Blanco et al. 2008), pudiendo afectar la criopreservación de los espermatozoides (Pérez-Pé et al. 2001). Si bien no se realizaron estudios sobre la composición seminal, se plantea considerarlo en futuros estudios de criopreservación que se realicen fuera de la estación reproductiva.

A su vez, otras condiciones de los machos utilizados para colectar las muestras seminales pueden estar afectando los resultados. Villagrán & Ungerfeld (2013) observaron que la calidad seminal del semen fresco y diluido con FTG 20 % fue mejor en machos que estaban alojados con hembras comparado con el semen colectado de machos que no tenían contacto con hembras. Estos autores plantearon que el contacto con las hembras estimula la actividad reproductiva de los venados de campo, por lo que si se evalúan otros diluyentes a ser utilizados fuera de la estación reproductiva se recomienda utilizar el semen de machos que estén en contacto con hembras.

Por otra parte, hay que considerar que la población de la ECFA puede estar afectada por endogamia, lo que también explicaría parcialmente los bajos valores espermáticos encontrados en esta tesis. En este sentido, Garde et al. (2003) encontraron una relación inversa entre el nivel de endogamia y la capacidad de sobrevivencia de los espermatozoides a la criopreservación. Para confirmarlo sería necesario correlacionar los resultados de estudios genéticos con los parámetros seminales.

7.7 Conclusiones

- El diluyente Triladyl preservó mejor las muestras de semen colectadas durante la estación reproductiva en comparación con el diluyente Andromed.
- Los diluyentes evaluados no permitieron preservar adecuadamente el semen colectado fuera de la estación reproductiva.

8 DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos de esta tesis deben ser interpretados considerando el bajo número de machos utilizados, y lo difícil que es el procedimiento de obtención de las muestras de una especie con alta sensibilidad al estrés. Sin embargo, son los primeros resultados que constituyen un punto de partida para realizar nuevos estudios en los que basar protocolos de congelación y descongelación, incluyendo ensayos de fertilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En la presente tesis se evaluó y describió las características del semen de venado de campo colectado mediante EE durante la estación reproductiva. A su vez se describieron los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides, lo que permitió determinar la existencia de 3 subpoblaciones espermáticas en los eyaculados. Si bien los parámetros del espermiograma variaron tanto entre machos como entre colecciones, los datos obtenidos son de suma utilidad para conocer los parámetros seminales normales de esta especie. A pesar de las variaciones, la calidad de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles se encontraron en el mismo rango que los reportados en otras especies de ciervo (Gosch et al. 1989; de Abreu et al. 2009). Los parámetros morfométricos se correlacionan con la susceptibilidad de los espermatozoides a la criopreservación (Esteso et al. 2006), por lo que contar con estos datos permitiría su inclusión al momento de realizar las evaluaciones de semen y por tanto determinar qué resultados se podrían esperar en cada muestra. Pese al bajo número de animales utilizado, los parámetros morfométricos fueron similares entre colecciones, lo que permite reafirmar la utilidad de estos parámetros en los procesos de evaluación.

El bajo volumen espermático obtenido en las muestras limitó la criopreservación. Además del bajo volumen, las muestras presentaron una baja concentración espermática por lo que no se pudo congelar muchas pajuelas de cada macho, e incluso en algunos casos sólo se criopreservó una pajuela con cada diluyente. Esto es una limitante a considerar para implementar programas de inseminación artificial.

El diluyente Triladyl criopreservó mejor que el Andromed las muestras colectadas durante la estación reproductiva. El diluyente FTG adicionado tanto con 10 % como con 20 % de yema de huevo no produjo resultados satisfactorios, por lo que no se recomienda su utilización en muestras colectadas fuera de la estación reproductiva. De todas formas, es necesario considerar que estas muestras numericamente tenían un bajo valor de calidad global seminal, lo que probablemente constituyera la principal limitante para la criopreservación.

9 CONCLUSIONES GENERALES

- La alta variabilidad de los parámetros del semen fresco, además de la baja concentración, volumen, calidad espermática (definida por los 3 parámetros de motilidad), y el alto porcentaje de espermatozoides con anormalidades morfológicas son una limitante para la criopreservación del semen de venado de campo.
- Los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides, la existencia de subpoblaciones, y la relación encontrada entre diferentes colecciones y los parámetros morfométricos, constituyen información valiosa tanto para la evaluación del semen fresco como para mejorar la criopreservación.
- El diluyente Triladyl criopreservó mejor que Andromed las muestras de semen colectadas durante la estación reproductiva.
- Los diluyentes evaluados no permitieron la criopreservación adecuada del semen colectado fuera de la estación reproductiva.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelhakeam, A., Graham, E., Vazquez, I.A., Chaloner, K.M., 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen semen: development of an extender for freezing: effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 28, 43–49.

Aboagla, E.M., Terada, T., 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1160-1172.

Aleuy, 2008. Caracterización de medidas testiculares y semen de Pudú (*Pudu pudu*) obtenido con un protocolo combinado de masaje digital transrectal y electroeyaculación durante su época reproductiva. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile.

Andrabi, S.M.H., Maxwell, W.M.C., 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 223-243.

Araki, H., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100-103.

Asher, G.W., 2011. Reproductive cycles of deer. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 170-175.

Asher, G.W., Adam, J.L., Otway, W., Bowmar, P., van Reener, G., Mackintosh C.G., Dratch, P., 1988a. Hybridization of Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. *J. Zool.* 215, 197-01.

Asher, G.W., Adam, J.L., James, R.W., Barnes, D., 1988b. Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronized oestrus. *Anim. Prod.* 47, 487-492.

Asher, G.W., Berg, D.K., Evans, G., 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 195-211.

Asher, G.W., Day, A.M., Barrell, G.K., 1987. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fert.* 79, 353-362.

Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E., Piomboni, P., 2001. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum. Reprod.* 16, 1365-1371.

Ballou, J.D., 1992. Potential contribution of cryopreserved germ plasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 29, 19-25.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. pp 285.

Benson, R.W., Pickett, B.W., Komarek, R.J., Lucas, J.J., 1967. Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *J. Anim. Sci.* 26, 1078-1081.

Beracochea, F., 2012. Comparación de diluyentes para preservación de semen de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, Uruguay.

Boersma, A., Braun, J., 1999. Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 112, 81-5.

Bousseau, S., Brillard, J.P., Marguant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M., 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluent. *Theriogenology* 50, 699-706.

Bronson, F.H., 1989. Mammalian reproductive biology. The University of Chicago Press. Chicago, EEUU. pp 325.

Bubenik, G.A., 1991. Regulatory mechanisms of the antler cycle and the selection of deer breeding stock by endocrine tests. En: *Wildlife Production-Conservation and Sustainable*

Development. Renecker, L.A., Hudson, R.J. (Eds). AFES Misc. Publ. 91-6. Univ. of Alaska. Fairbanks. AK. EEUU. pp 521-529.

Bubenik, G.A., 2006. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle- a review. *Vet. Arhiv.* 76, 275-285.

Buffone, M.G., Doncel, G.F., Briggiler, C.I.M., Vazquez-Levin, M.H., Calamera, J.C., 2004. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum. Reprod.* 19, 139-146.

Campbell, R.C., Dott, H.M., Glover, T.D., 1956. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.* 48, 1-8.

Carvalho, C.T., 1973. O veado campeiro (Mammalia, Cervidae). *Boletim Tecnico Secretaria de Estado dos Negocios da Agricultura, Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais, Insituto Florestal, Brasil.* pp 9.

Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K.M., 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallion. *Theriogenology* 47, 575-582.

Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkinson, R.W., Memon, M.A., Hoyt, P.G., 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy. Sci.* 71, 1638-1646.

Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 237-268.

Cheng, F.P., Wu, J.T., Chan, J.P., Wang, J.S., Fung, H.P., Colenbrander, B., Tung, K.C., 2004. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* 61, 1605–16.

CITES, 2013. Appendices I, II and III. Valido desde el 12 Junio de 2013. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>. Fecha de consulta 20 de marzo de 2014.

Clutton-Brock, T., Guinness, F.E., Albon, S.D., 1982. Red deer: Behavior and ecology of two sexes. University of Chicago. Chicago. EEUU. pp 378.

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

Comizzoli, P., Songsasen, N., Hagedorn, M., Wildt, D.E., 2012, Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. *Theriogenology* 78, 1666-1681.

Comizzoli, P., Wildt, D.E., 2014. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 91-98.

Cortes, S., Santiago-Moreno, J., González-Bulnes, A., 1996. Recogida de semen de muflón (*Ovis gmelini musimon*) mediante vagina artificial. *Trofeo* 1317, 34-36.

Cosse M., 2001. Dieta y solapamiento de la población de venado de campo “Los Ajos”, (*Ozotoceros bezoarticus* L, 1758) (Artiodactylo: Cervidae). Tesis de Maestría. PEDECIBA. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

Cummins, J.M., Woodall, P.F., 1985. On mammalian sperm dimension. *J. Reprod. Fertil.* 75, 153-175.

de Abreu, C., Martínez, A.C., de Moraes, W., Juvenales, J.C., Moreira, N., 2009. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). *Pesq. Vet. Bras.* 29, 993-998.

de Ruigh, L, Bosch JC, Brus MC, Landman B, Merton JS., 2006. Ways to improve the biosecurity of bovine semen. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 268-274.

Dellafiore, C.M., Demaría, M., Maceira, N., Bucher, E., 2003. Distribution and abundance of the pampas deer in San Luis province, Argentina. *J. Neotrop. Mammal.* 10, 41-47.

Drion, P.V., Hanzen, C., Wirth, D., Beckers, J.F., Leboeuf, B., Ropstad, E., Balligand, M., Bauvir, E., Gabriela, A., Collin, B., 2003. Physiologie de la reproduction et endocrinologie chez les cervidés: une revue. *Ann. Méd. Vét.* 147, 291-213.

Duarte, J.M.B., Arantes, I.G., Garcia, J.M., Nascimento, A.A., 1993. Captura e avaliacao de uma populacao de *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* no Brasil. In: UICN. Population and Viability Assessment for the Pampas Deer. SSC/IUCN. No pages.

Durrant, B. S., 1990. Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potencial. *ILAR J.* 32, 2-10.

Durrant, B.S., 2009. The importance and potential of artificial insemination CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology* 71, 113-122.

Durutovic, O., Lalic, N., Milenkovic-Petronic, D., Bojanic, N., Djordjevic, D., Milojevic, B., Ladjevic, N., Mimic, A., Tulic, L., Dzamic, Z., Micic., S., 2013. The correlation of biochemical and morphologic parameters in the assessment of sperm maturity. *Urology* 82, 1296-1299.

Eddy, E.M., 2006. The spermatozoon. En: Neill, J. D. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3° Ed. London, Elsevier. pp 3-38.

Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Garde, J.J., 2003. Head dimension of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *CryoLetters* 24, 261-268.

Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J., 2009. Identification of sperm head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 206-211.

Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Quintero-Moreno, A., Garde, J.J., 2006. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 27, 662-670.

Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.

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. *Zoo. Sci.* 30, 1110-1116.

Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Esteso, M.C., Soler, A.J., de Paz, P., Anel, L., Garde, G.G., 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 67, 738-753.

Fiser, P.S., Fairfull, R.W., 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 25, 473-84.

Fumagalli, F., Villagrán, M., Damián, J.P., Ungerfeld, R., 2012. Physiological and biochemical parameters in response to electroejaculation in adult and yearling anesthetized pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 308-312.

Gao, D., Critser, J. K., 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41, 187-196.

García M.A., Graham, E.F., 1989. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. II. Effects of sugars and sugar alcohols on post thaw motility. *Theriogenology* 31, 1029-1037

Garde, J.J., Soler, A.J., Cassinello, J., Crespo, C., Malo, A.F., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 2003. Semen cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorri*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69, 602-611.

Gil, M.C., García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., García-Marín, L.J., 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71, 254-63.

Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., Miragaya, M., 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 104, 359–69.

Giulini, S., Pesce, F., Madgar, I., Marsella, T., Volpe, A., Aloysio, D., Battaglia, C., 2004. Influence of multiple transrectal electroejaculation on semen parameters and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil. Steril.* 82, 200-204.

Goldman, B.D., 2001. Mammalian Photoperiodic Sistem: Formal Properties and Neuroendocrine Mechanisms of Photoperiodic Time Measurement. *J. Biol. Rhyt.* 16, 283-301.

Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 1991. Sperm competition influences sperm size in mammal. *Proc. R. Soc. Lond. R.* 243, 181-185.

González, S., 1993. Situación poblacional del venado de campo en el Uruguay. En: Population and habitat viability assessment for the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. Reunión informativa. IUCN. Rocha, Uruguay.

González, S., Alvarez-Valín, F. Maldonado, J.E., 2002. Morphometric differentiation of endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with descriptions of new subspecies from Uruguay. *J. Mammal.* 83, 1127-1140.

González, S., Cosse, M., Góss-Braga, F., Vila, A.R., Merino, M.L., Dellafiore, C., Cartes, J.L., Maffei, L., Gimenez-Dixon, M., 2010. Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758). In: Duarte, J.M.B., González, S. (Eds.), *Neotropical Cervidology: biology and medicine of Latin American deer*. Funep/IUCN, Jaboticabal. pp 119–132.

González, S., Maldonado, G., Leonard, J.A., Vilá, C., Barbanti-Duarte, J.M., Merino, M., Brum-Zorrilla, N. Wayne, R.K., 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mol. Ecol.* 7, 47-56.

González-Pensado, S.X., 2011. Estacionalidad reproductiva en machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos y juveniles. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Biología. Montevideo, Uruguay.

Gosch, B., Bartolomaeus, T., Fischer, K., 1989. Light and scanning electron microscopy of fallow deer (*Dama dama*) spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 87, 187-192.

Gosch, B., Fischer, K., 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer *Dama dama* and their relationship to the antler cycle. *J. Reprod. Fertil.* 85, 7–17.

Góss-Braga, F., 1999. Redescoberta do veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, no estado do Paraná-Brasil. En: II Taller de Cérvidos del Uruguay. Montevideo, Uruguay.

Gravance, C.G., Casey, M.E., Casey, P.J., 2009. Pre-freeze bull sperm head morphometric related to post-thaw fertility, *Anim. Reprod. Sci.* 114, 81-88.

Gravance, C.G., Liu, I.K., Davis, R.O., Hughes, J.P., Casey, P.J., 1996. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 108, 41– 6.

Greyling, J.P.C., Gobbelaar, J.A.N., 1983. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13, 250-252.

Haigh, J.C., 1984. Artificial insemination of two white-tailed deer. *J. Am. Vet.Med. Assoc.* 18, 146-147.

Haigh, J.C., Cates, W.F., Glover, G.J., Rawlings, N.C., 1984. Relationship between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fert.* 70, 413-418.

Haigh, J., Dradjat, A., English, A., 1993. Comparison of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. *J. Zoo. Wildl. Med.* 24, 454-458.

Hammerstedt, R.H., Graham JK., 1992. Cryopreservation of poultry sperm. The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26-38.

Hammerstedt, R. H., Keith, A.D., Snipes, W., Amann, R.P., Arruda, D., Griel, L.C., 1978. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. *Biol. Reprod.* 18, 686-696.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73-88.

He, S., Woods., Lii L.C., 2003. Effects of glycine and alanine on shortterm storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology* 46, 17–25

Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the sperm class analyzer. *Theriogenology* 66, 996-1003.

Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Foll, J., Aumüller, T.R., Braun, J., 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J. Androl.* 22, 104-10.

Holt, W.V., 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3-22.

Holt, W.V., 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58.

Holt, W.V., Head, M.F., North, R.D., 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing-observation with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 46, 1086-1094.

Holt, W.V., Morris, G.J., Coulson, G., North, R.D., 1988. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 246, 305-314.

Holt, W.V., Pickard, A.R., 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.* 4, 143-150.

Jackson, J.E., 1986. Antler cycle in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) from San Luis, Argentina. *J. Mammal.* 67, 175-176.

Jackson, J.E., 1987. *Ozotoceros bezoarticus*. *Mamm. Species.* 295, 1-5.

Jacobson, H.A., Bearden, H.J., Whitehouse, D.B., 1989. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J. Wildl. Manag.* 53, 224-227.

Jayaprakash, D., Patil, S.B., Majumdar, K.C., Navin, Kumar, M., Shivaji, S., 2001. Semen characteristics of the captive Indian leopards, *Panthera pardus*. *J. Androl.* 22, 25-33.

Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219-228.

Johnston, L.A., Lacy, R.C., 1995. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donor. *Cryobiology* 32, 68-77.

Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A., Paresh-Khiavi, M., 2010. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Monghani ram spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2, 318-325

Katkov, I.I., Katkova, N., Crister, J.K., Mazur, P., 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration. *Cryobiology* 37, 325-338.

Keating, J., Grundy, C.E., Fivey, P.S., Elliott, M., Robinson, J., 1997. Investigation into the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 110, 71-77.

Kiso, W.K., Brown, J.L., Siewerdt, F., Schmitt, D.L., Olson, D., Crichton, E.G., Pukazhenth, B.S., 2011. Liquid semen storage in elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*): species differences and storage optimization. *J. Androl.* 32(4), 420-431.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 113-141.

Lincoln, G.A., 1971. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J. Zoo. Lond.* 163, 105-123.

Lincoln, G.A., Guinness, F., Short, R.V., 1972. The way in which Testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Horm. Behav.* 3, 375-396.

Lincoln, G.A., Short, R.V., 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Prog. Horm. Res* 36, 1-52.

Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M., 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotech.* 19, 962-964.

Malo, A.F., Garde, J., Soler, A.J., García, A.J., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 72, 822-29.

Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., Roldan, E.R.S., 2006. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246-249.

Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Estes, M.C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2010. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73, 437-448.

Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A. J., Fernández-Santos, M.R., Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2012. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. *Theriogenology* 77, 1529-1539.

Martínez-Pastor, F., Martínez, F., García-Macías, V., Estesó, M., Anel, E., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., de Paz, P., Garde, J., Anel, J., 2006. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 66, 1165-1172.

Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Garde, J.J., de Paz, P., Anel, L., 2009. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 71, 628-638.

Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Álvarez, M., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P., 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Bio. Reprod.* 72, 316-327.

Mazur, P., 1984. Freezing of living cells. Mechanisms and implications. *Am. Physiol. Soc.* 247, c125-c142.

Meltzer, D.G.A., Van Vuuren, M., Bornean, M.S., 1988. The suppression of electroejaculation in the chacma baboon (*Papio ursinus*) by azaperone. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 59, 53-53.

Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology* 26, 823-827.

Morato, R.G., Conforti, V.A., Azevedo, F.C., Jacomo, A.T.A., Silveira, L., Sana, D., Nunes, A.L.V., Guimaraes, M.A.B.V., Barnabe, R.C., 2001. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction* 122, 745-751.

Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturir, D., Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from the hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695-1706.

Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé., R., Cebrián-Pérez., J.A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 18-31.

Mulley, R.C., Moore, N.W., English, A.W., 1988. Successful uterine insemination of fallow deer with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 39, 1149-1153.

Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596-603.

Paasch, U., Grunewald, S., Fitzl, G., Glander, H.J., 2003. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J. Androl.* 24, 246-52.

Parera, A, Moreno, D., 2000. El venado de las pampas en Corrientes, diagnóstico de su estado de conservación y propuestas de manejo: situación crítica. Fundación Vida Silvestre (Argentina). pp 40.

Patil, B., Jayaprakash, D., Shivaji, S., 1998. Cryopreservation of semen of tigers and lions: computerized analysis of the motility parameters of the spermatozoa. *Curr. Sci.* 75, 930–935.

Pautasso, A.A., Peña, M.I., Mastropaolo, J.M., Moggia, L., 2002. Distribución y conservación del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) en el norte de Santa Fe, Argentina. *J. Neotrop. Mamm.* 9, 64-69.

Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J.A., Johannison, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J. Androl.* 26, 716-723.

Pérez, W., Vazquez, N., Ungerfeld, R., 2013. Gross anatomy of the male genital organs of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). *Anat. Sci. Internat.* 88, 123-129.

Perez-Llano, B., Yenes-Garcia, P., Garcia-Casado, P., 2003. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37° C. *Theriogenology* 60, 1401-1407.

Pérez-Pé, R., Barrios, B., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2001. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in aqueous two-phase system. *J. Chromatog.* 760, 113-121.

Persson, Y., Strid, G, Håård, M., Söderquist, L., 2007. Comparison of semen samples collected from beef bulls by transrectal massage or artificial vagina. *Vet. Rec.* 161, 662-662.

Petrunkina, A.M., Töpfer-Petersen, E., 2000. Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membrane. *Reprod. Fertil. Dev.* 12, 297-305.

Petrunkina, A.M., Waberski, D., Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E., 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3-17.

Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 63, 215-225.

Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G., 1980. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60, 403-407.

Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.

Ralls, K., Ballou, J.D., 1986. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends Ecol. Evol.* 1, 19-22.

Ralls, K., Brugger, K., Ballou, J.D., 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science* 206, 1101-1103.

Ramón, M., Soler, A.J., Ortiz, J.A., García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Roldan, E.R.S., Garde, J.J., 2013. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity en red deer. *Biol. Reprod.* 89, 110-117.

Renard, J.P., Babinet, C., 1984. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straw with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exp. Zool.* 230, 443-448.

Reyes, E., Bubenik, G.A., Schams, D., Lobos, A., Enriquez, R., 1997. Seasonal changes of testicular parameters in southern pudu *Pudu pudu* in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. *Act. Theriol.* 42, 25-35.

Ritar, A.J., Salamon, S., 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35, 305-312.

Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Garde, J.J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., del Olmo, A., Soler, A.J., Arregui, L., Crespo, C., González, R., 2006. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of genetic resource Banks. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 82-92.

Roy, A., 1957. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature.* 179, 318-319.

Rudenko, S.V., Gapochenko, S.D., Bondarenko, V.A., 1984. Effect of glycerol on the capacitance and conductivity of bilayer lipid membrane. *Biophysics* 29, 245-249.

Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1996. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24, 167-173.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37, 185-249.

Salamon, S., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77-111.

Santymire, R.M., Marinari, P.E., Kreeger, J.S., Wildt, D.E., Howard, J.G., 2006. Sperm viability in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) is influenced by seminal and medium osmolality. *Cryobiology* 53, 37-50.

Soler, A.J., Estes, M.C., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 64, 1503-1517.

Soler, C., De Monserrat, J.J., Gutiérrez, R., Núñez, J., Núñez, M., Pérez-Sánchez, F., Cooper, T.G., 2003b. Use of the Sperm-Class Analyser® for objective assessment of human sperm morphology. *Int. J. Androl.* 26, 262-270.

Soler, A.J., Astore, V., Sestelo, A., Rivolta, M., Jácome, L.N., Garde, J.J., 2003a. Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. *Theriogenology* 60, 511-520.

Soler, C., De Monserrat, J.J., Gutiérrez, R., Núñez, J., Núñez, M., Pérez-Sánchez, F., Cooper, T.G., 2003b. Use of the Sperm-Class Analyser® for objective assessment of human sperm morphology. *Int. J. Androl.* 26, 262-270.

Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M.C., Núñez, J., Cucho, H., 2014. Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 71-78.

Surai, P.F., Speake, B.K., Noble, R.C., Mezes, M., 1999. Species-specific differences in the fatty acid profiles of the lipids of the yolk and of the liver of the chick. *J. Sci. Food. Agric.* 79, 733-736.

Thornhill, N.W., 1993. The Natural History of Inbreeding and Outbreeding. The University of Chicago Press, Chicago.

Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V., 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. J. Reprod. Fertil. 117, 271-280.

Thurston, L.M., Watson, P.F., Anan, J.M., Holt, W.V., 2001. Morphologically distinct sperm subpopulation defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. J. Androl. 22, 382-394.

Umopathy, G., Sontakke, S.D., Reddy, A., Shivaji, S., 2007. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). Theriogenology 67, 1371-1378.

IUCN., 2014. IUCN Red List of Threatened Species. [<http://www.iucnredlist.org>]. Downloaded on 24 February 2014.

Ungerfeld, R., González-Pensado, S., Villagrán, M., Bielli, A., Rossini, C., Morales, J., Pérez, W., Damián, J.P., 2011. Biología reproductiva de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Departamento de publicaciones, Unidad de comunicación de la Universidad de la República (UCUR), Montevideo, Uruguay.

Ungerfeld, R., González-Pensado, S., Bielli, A., Villagrán, M., Olazabal, D., Pérez, W., 2008. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. Acta. Vet. Scand. 50, 16.

Vianna, F.P., Papa, F.O., Zahn, F.S., Melo, C.M., Dell'Aqua Jr., J.A., 2009. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreservation bull semen. Anim. Reprod. Sci. 113, 279-282.

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Yániz, J.L., 2013. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pig using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). Anim. Reprod. Sci. 139, 182-189.

Vila A, Beade M., 1997. Situación de la población del venado de las pampas en la Bahía Samborombón. Boletín Técnico 37, Fundación Vida Silvestre (Argentina). pp 30.

Villagrán, M., Ungerfeld, R., 2013. Permanent contact with females increases testosterone and improves fresh semen traits in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. Anim. Reprod. Sci. 143, 85-90.

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. J. Therm. Biol. 1, 137-141.

Watson, P.F., 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fert. 62, 483-492.

Watson, P.F., 1995. The role of lipid and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Feril. Dev. 7, 871-891

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal. Reprod. Sci. 60-61, 481-492.

Watson, P.F., Martin, I.C.A., 1975. Effects of egg yolk, glycerol and freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 28, 153-159.

Wells, M.E., Wondafrash, T., Awa, O.A., Stephens, D.F., 1970a. Effect of sexual rest and subsequent regular collection on acrosome characteristics of bull spermatozoa. J. Anim. Sci. 31, 67-71.

Wells, M.E., Awa, O.A., Jay, L.G., Fancy, S.S., 1970b. Effect of sexual rest and frequency of ejaculation on sperm acrosomal morphology. J. Dai. Sci. 54, 526-530.

Wildt, D.E., 1992. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. Anim. Reprod. Sci. 28, 247-257.

Wildt, D.E., Rall, W.F., Crister, J.K., Monfort, S.L., Seal, U.S., 1997. Genome resource banks: 'living collections' for biodiversity conservation. *Bioscience* 47, 689-698.

Woelders, H., Matthijs, A., Engel, B., 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35, 93–105.

Zomborszky, Z., Nagy, S., Nánássy, L., Szabari, M., Bodó, S., 2005. Experiences in deer cryopreservation under practical conditions- a pilot study. *Anim. Reprod. Sci.* 90, 185-190.



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)

F. Beracochea^{a,*}, J. Gil^b, A. Sestelo^c, J.J. Garde^d, J. Santiago-Moreno^e,
F. Fumagalli^a, R. Ungerfeld^a

^a Departamento de Fisiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires – Fundación Bioandina Argentina, Argentina

^d Sabio IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Campus Universitario sn, Albacete, Spain

^e Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 March 2014

Received in revised form 8 July 2014

Accepted 9 July 2014

Available online xxx

Keywords:

Cervidae

Endangered species

Electroejaculation

Sperm sub-population

ABSTRACT

Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) is a native endangered species. Knowledge of the basic spermiogram characteristics and the morphometric descriptors is necessary to effectively develop sperm cryopreservation. In other species, sperm sub-population is related to sperm cryo-resistance. The objective was to provide a general description of the sperm, including sperm head morphometric descriptors, its repeatability, and the existence of sperm sub-populations. Sperm were obtained from adult males by electroejaculation during the breeding season. The motility score was 3.4 ± 0.2 (mean \pm SEM) and progressive motility was $59.4 \pm 3.7\%$. Ejaculated volume was $413.9 \pm 51.0 \mu\text{l}$, the total number of sperm ejaculated was $321.2 \pm 55.4 \times 10^6$. Also, $63.3 \pm 3.1\%$ of the sperm were morphologically abnormal and $23.7 \pm 2.3\%$ had acrosome damage. The sperm head length was $7.6 \pm 0.01 \mu\text{m}$, width $4.4 \pm 0.01 \mu\text{m}$, area $28.1 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ and the perimeter was $21.9 \pm 0.04 \mu\text{m}$. There was a positive relationship among morphometric descriptors and the motility score, overall motility and progressive motility. Also length ($P=0.011$), width ($P=0.003$), area ($P=0.006$) and perimeter ($P=0.009$) of sperm head obtained in two different collections were positively related. Overall, the low concentration, volume, overall quality and abnormal morphology, and wide variation of these variables may be a limitation for the development of sperm cryopreserved banks. There were three sperm sub-populations with different morphometric characteristics. The morphometric descriptors are maintained similarly among different collections.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*; Linnaeus, 1758) is a native deer of the southern cone of South America. Due to direct and indirect human influences, the population has declined considerably (González et al., 2010). Therefore, the Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora (CITES)

* Corresponding author at: Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay. Tel.: +598 2 6286955; fax: +598 2 6280130.
E-mail address: fberacochea@gmail.com (F. Beracochea).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>
0378-4320/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

considered this species as endangered (Appendices 1; CITES, 2013). Since 2008 pampas deer are included in the Red Book of Endangered Species in the category of near threatened (IUCN, 2013). Currently, there are small populations of the species in Argentina (*O.b. celer*, *O.b. leucogaster*); Brasil (*O.b. bezoarticus*, *O.b. leucogaster*) and Uruguay (*O.b. uruguayensis*, *O.b. arerunguaensis*). Based on cytogenetic, molecular (González et al., 1998) and morphometric (González et al., 2002) data, two subspecies endemic from Uruguay have been identified. *O. b. arerunguaensis* inhabits in Salto (31°65' S, 56°43' W) and *O. b. uruguayensis* in Rocha (33°45' S, 54°02' W). There is also a third population in semi-captive conditions in the Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA), Uruguay (34°3' S, 54°1' W; altitude: ~200 m), originating from animals captured in Salto, with approximately 80 animals.

Despite being an endangered species, there is scarce information related to the biology and conservation of pampas deer. Reproductive biotechnologies, as sperm cryopreservation, artificial insemination, or *in vitro* fertilization are strategies used to preserve endangered species (Holt and Pickard, 1999), including cervids (Garde et al., 2006). Thus, it is essential the cryopreservation of pampas deer sperm to implement reproductive biotechnologies. As deer are not easily domesticated, sperm are usually obtained by electroejaculation, as occurs in other deer species (Fernández et al., 2013; Jacobson et al., 1989).

A limitation to improved reproductive biotechnology in pampas deer is the scarce information about sperm descriptors and sperm characteristics. Preliminary reports in pampas deer sperm show a great range in volume (0.1–0.6 ml) of semen collected, overall motility (20–70%) and total number of sperm per ejaculate (34–2170 millions of sperm/mL; Duarte et al., 1993; Ungerfeld et al., 2008).

Other than the data obtained by the basic spermogram, the computer-assisted sperm morphometry analysis software (ASMA) provides information of morphometric descriptors more directly linked to sperm motility (Malo et al., 2006), cryopreservation (Esteso et al., 2006), sperm sub-population (Esteso et al., 2009) and fertility (Casey et al., 1997). The existence of sperm head morphometric sub-populations has been identified in several mammalian species (Soler et al., 2014; Esteso et al., 2009; Núñez-Martínez et al., 2006; Gravance et al., 1996). Esteso et al. (2006) reported that sperm samples more resistant to cryopreservation have more small sperm, suggesting that the variability in sperm head dimensions of individual stags may be a reliable indicator of sperm freezing capacity. Therefore, the characterization of the morphometric descriptors and of the existence of sperm sub-populations would be useful to improve the probability of effectively developing sperm cryopreservation. Overall, the knowledge of pampas deer sperm characteristics such as the basic spermogram and morphometric descriptors would be useful to develop reproductive biotechnologies. Therefore, the aim of the present study was to provide a general description of pampas deer sperm, including the basic spermogram and to determine size and shape of the sperm head with the aid of ASMA. In addition, determinations were made about the relationship of morphometric descriptors among sperm variables, repeatability of the

sperm head morphometric descriptors among different collections and presence of sub-populations from sperm obtained by electroejaculation during the breeding season.

2. Materials and methods

2.1. Location and general procedures

The study was performed at the ECFA, where the animals were maintained in enclosures of 0.5–1 ha. Males were allocated in single male groups since at least 6 months before the study was initiated without direct contact with females. All the animals had free access to water and natural pastures, and from Monday to Saturday received 600 g of a diet formulated for dairy cows. Sperm samples were obtained from 18 adults males (3–7 years of age, 22.0–35.3 kg) during the breeding season (late summer–mid autumn; Ungerfeld et al., 2008), over a 4 year period (2008, 2009, 2010 and 2012) and were used to characterize the spermogram. A total of 38 semen collections were performed (one to five collections per male).

Males were captured as reported by Fumagalli et al. (2012). Briefly, anesthetic darts containing ketamine 5% (1.6 mg/kg; Vetanarcol; Laboratorio Köning, Buenos Aires, Argentina), xylazine 10% (2.0 mg/kg; Sedomin; Laboratorio Köning, Buenos Aires, Argentina) and atropine 1% (0.013 mg/kg; Atropine sulfato; Laboratorio Ion, Montevideo, Uruguay) were projected from a blowpipe. The animals were transported in a stretcher, and monitored during all the procedures for vital signs (heart, pulse, oximetry, respiratory rates, as well as, rectal temperature). After the electroejaculation process was completed (see below), the animals were transported back to their enclosures, and anesthesia was reversed administering yohimbine hydrochloride (0.26 mg/kg; Reverze, Laboratorio Vetcross, Montevideo, Uruguay) in the jugular vein.

2.2. Sperm collection

Electroejaculation was performed with a rectal probe (300 mm length × 19 mm width, with 30 mm electrodes; P-T electronics, model 303, Oregon, USA), with a series of 10 pulses (4–5 s per pulse) of voltage stimulus, with rest intervals of 2–3 s per series, increasing 1V in each series, from the initial 1V stimulation until ejaculation. The time to which ejaculation began was recorded. Prior to electroejaculation, the rectum was emptied of feces, the prepuce area was washed with physiological saline serum solution and exteriorization of the penis was performed.

2.3. Basic spermogram

Immediately after ejaculation the color, pH, motility score, overall motility, progressive motility, volume (micropipette: Gilson, Valle del Oise, France), and the concentration of sperm in the ejaculate (Neubauer chamber) were determined. Sperm motility was directly evaluated in the fresh undiluted sample with a phase contrast microscope (subjective system), in at least five fields per sample according to the previously described methods of Evans and Maxwell (1987). Motility score was assessed using a

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

scale of 0–5: 0, no motility; 1, weak tail movement, no forward progression; 2, slow forward movement, often in a circular pattern; 3, moderate forward movement; 4, rapid forward movement; 5, very rapid forward movement.

The sperm membrane integrity of samples obtained in 2008 and 2009 were stained with eosin–nigrosine (E–N; Campbell et al., 1956), and the samples obtained in 2010 and 2012 with the hypo-osmotic swelling test (HOS test) (Jeyendran et al., 1984). The modification of the technique was due to problems with E–N availability. For the E–N technique, smears were prepared by placing 5 μ l of the sperm sample with 10 μ l of E–N, mixed, and the drop was extended with a glass slide. The samples were observed with an optical microscope at 1000 \times (Nikon, model Eclipse E200, Shanghai, China). To perform the HOS test, 10 μ l of sperm were mixed in 100 μ l of hypo-osmotic solution (1.02 g/100 mL; 100 mOsm), and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 15 min, performing fixations with glutaraldehyde 2% in 0.33 M cacodylate/HCl buffer (pH = 7.3). The fixed samples were observed with an optical microscope at 400 \times phase contrast (Nikon, model Eclipse E200, Shanghai, China). With both techniques, 100 spermatozoa were counted in each sample. The incidence of sperm with different abnormalities (morphology), and with acrosomal integrity (intact, damage and lost) was determined (400 \times microscope with phase contrast) in samples fixed with 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer (Pursel and Johnson, 1974).

2.4. Morphometric descriptors

The sperm samples obtained from 17 males were used to determine the morphometric descriptors. Thin smears were prepared with 10 μ l of sperm, air-dried, and immersed in methyl alcohol (Methanol for analysis ACS, Dorwil Química Analítica, Buenos Aires, Argentina) five times for 1 s. Subsequently, the smears were stained using Hemacolor[®] (Merck), a procedure adapted from Estes et al. (2003) for red deer sperm. Stained sperm samples were permanently mounted with a coverslip and dibutyl phthalate xylene (DPX). Stained slides were used to perform ASMA using the morphometry module of a commercially available system (Sperm-Class Analyser[®], SCA, Microptic, Barcelona, Spain). The device was equipped with a Nikon microscope (Labophot-2, Tokyo, Japan) and a Sony video camera (CCD AVC-D7CE; Sony Corporation, Tokyo, Japan) connected to a Pentium 950 MHz processor. The illumination source was centered and the intensity of the bulb and the gain and offset of the camera were standardized for all samples. The configuration of the computer system included a PIP-1024 B video digitizer board (Matrox Electronic Systems Ltd, Quebec, Canada), the sperm image analysis software and a high-resolution assistant monitor Sony Trinitron PVM-1443MD (Sony Corporation). The array size of the video frame recorder was 512 \times 512 \times 8 bits, digitized images were made up of 262,144 pixels (picture elements) and 256 gray levels. Resolution of images was 0.15 and 0.11 μ m per pixel in the horizontal and vertical axes, respectively.

Four morphometric dimensions were measured in each sperm head (total, 100 spermatozoa per sample):

length (L), width (W), area (A) and perimeter (P). Five shape values were calculated from those dimensions: ellipticity (L/W), rugosity ($4\pi A/P^2$), elongation [$(L - W)/(L + W)$], regularity ($\pi LW/4A$) and $p2a$ ($P^2/4\pi A$). The value $p2a$ compares the perimeter of an object to its area (Sailer et al., 1996), considering a minimum value of 1.0 for a circle. If this ratio increases, the head of spermatozoa differs to a greater extent from a circle.

Also samples of morphometric descriptors from nine males were obtained in two different collections to determine the repeatability of these data. Moreover, the data of size and shape obtained from 17 males were used to identify sub-populations within each ejaculate using clusters according to the sperm head measurements and shape values.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. A linear regression was used to relate the morphometric descriptors (length, width, area, perimeter) with the motility score, overall motility, progressive motility and morphologic abnormalities. The overall motility, and the progressive motility had a skewed distribution, thus, these data were normalized by arcsine transformation before statistical analysis. A linear regression analysis was used to ascertain the relationship of the sperm head size obtained in two different collections.

The data matrix of morphometric analysis to found sub-population in the ejaculated consisted of 1700 observations of sperm heads (100/male analyzed). Statistical analysis was done using a k -means cluster analysis to classify size and shape factors into a reduced number of sub-populations according to the sperm head dimensions (Esteso et al., 2009). The procedure that was applied required the setting of the number of clusters *a priori*. The cluster numbers were determined in a series of preliminary tests until the optimal number of clusters was determined. Fewer differences between sub-populations were obtained with two than with three clusters. With four and five clusters, however, one of the sub-populations included few sperm and only from a few males. Therefore, the final number of clusters was set at three. Normality of morphometric descriptors was determined using the Shapiro-Wilks test before making comparisons with the ANOVA. $A P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Sperm collection and basic spermogram

Semen was obtained in 37 of the 38 collection attempts and from these three samples were rejected due to contamination with urine. Males started ejaculations with stimulations of between 1 and 6 V.

The semen color varied from transparent, yellow to white, and the average pH was 7.5 ± 0.4 (range 7.0–8.5). The volume of the ejaculate was $413.9 \pm 51.0 \mu$ l (range: 50–1655 μ l), sperm concentration $792.2 \pm 96.2 \times 10^6$ sperm/mL (range: 55.6 – 1890×10^6) and total sperm in the ejaculate (volume \times sperm concentration) $321.2 \pm 55.4 \times 10^6$ (range: 20.1 – 1324.8×10^6).

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

Table 1
Percentages of morphologies at the head, midpiece and tail of sperm from pampas deer males (*Ozotoceros bezoarticus*) obtained by electroejaculation under general anesthesia (n = 34 sperm samples).

Abnormality	Mean ± SEM (%)	Range (%)
Head		
Big	0.3 ± 0.1	0–4.2
Small	0.4 ± 0.1	0–3.8
Rounded	1.1 ± 0.4	0–9.8
Piriform	5.0 ± 1.3	0–35.8
Elongated	0.5 ± 0.4	0–15.0
Lost	10.9 ± 1.9	0–54.5
Midpiece		
Elongated	0.04 ± 0.04	0–1.6
Abaxial implantation	2.8 ± 0.9	0–31.2
Tuned	0.09 ± 0.06	0–2.5
Proximal drop	27.5 ± 2.7	2.3–72.4
Bent	7.0 ± 1.1	0–25.7
Distal drop	14.3 ± 1.9	0–48.0
Tail		
Coiled	6.3 ± 1.4	0–35.9
Short	0.04 ± 0.04	0–1.6
Bent	18.4 ± 3.3	0–75.4
Hook	5.2 ± 1.9	0–64.2

The motility score was 3.4 ± 0.2 (range: 1.5–5.0), overall motility $69.1 \pm 3.2\%$ (range: 25–90%), and progressive motility $59.4 \pm 3.7\%$ (range: 5–90%). In 78.8% and 39.4% of the samples the motility score was equal or greater than 3 and 4, respectively. There were 93.4% and 63.4% of the samples with at least 50% and 70% overall motility, respectively. The percentage of progressive motility equal or greater than 60%, 70% and 80% were 57.6%, 39.4% and 15.1%, respectively. Mean percentage of sperm with intact membranes of samples evaluated with E–N was $80.2 \pm 6.9\%$ (range: 72–93%) and with the HOS test $90.9 \pm 1.1\%$ (range: 85–96%).

The percentage of morphologic abnormalities is shown in Table 1. Overall, $63.3 \pm 3.1\%$ (range: 20–89%) of the sperm were morphologically abnormal. Moreover, 76.5% of the samples had more than 50% of the sperm with abnormalities. From these, $18.2 \pm 4.1\%$, $51.7 \pm 4.8\%$, and $30.0 \pm 4.7\%$ had abnormalities of the head, midpiece, and tail, respectively. The percentages of spermatozoa with damaged and lost acrosomes were $23.7 \pm 2.3\%$, and $4.3 \pm 0.8\%$, respectively.

3.2. Morphometric descriptors

The morphometric descriptors of the sperm head (size and shape) are presented in Table 2. Head length had a positive relationship with motility score ($R = 0.54$, $P = 0.03$; Fig. 1a), overall motility ($R = 0.54$, $P = 0.03$; Fig. 1b) and progressive motility ($R = 0.53$, $P = 0.03$; Fig. 1c). Head area and perimeter had a positive relationship with motility score ($R = 0.50$, $P = 0.04$; $R = 0.50$, $P = 0.05$; respectively). Ellipticity and elongation tended to have a positive relationship with overall motility ($R = 0.42$, $P = 0.09$; $R = 0.46$, $P = 0.06$; respectively). No relationships were found among the size or shape of sperm head and the abnormalities.

There was a positive relationship between the morphometric descriptors recorded in the first and second collection in the same males: length ($R = 0.79$, $P = 0.011$),

Table 2
Morphometric descriptors (size and shape) of sperm head of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) (n = 1700 sperm heads).

	Mean ± SEM	Range
Size values		
Length (μm)	7.6 ± 0.01	5.7–12.1
Width (μm)	4.4 ± 0.01	3.2–6.5
Area (μm ²)	28.1 ± 0.07	16.8–42.0
Perimeter (μm)	21.9 ± 0.04	16.6–40.2
Shape values		
Ellipticity	1.7 ± 0.005	1.1–2.9
Rugosity	0.7 ± 0.001	0.3–0.9
Elongation	0.3 ± 0.001	0.06–0.5
Regularity	0.9 ± 0.001	0.8–1.3
p2a	1.4 ± 0.003	1.1–3.1

Shape value: p2a consider a minimum value of 1.0 for a circle.

width ($R = 0.86$, $P = 0.003$), area ($R = 0.83$, $P = 0.006$) and perimeter ($R = 0.59$, $P = 0.009$).

3.3. Sperm sub-populations

Three sperm sub-populations were identified after the cluster analysis of the 1700 individual sperm based on different values of sperm head dimension. All the morphometric variables, rugosity and p2a, were different

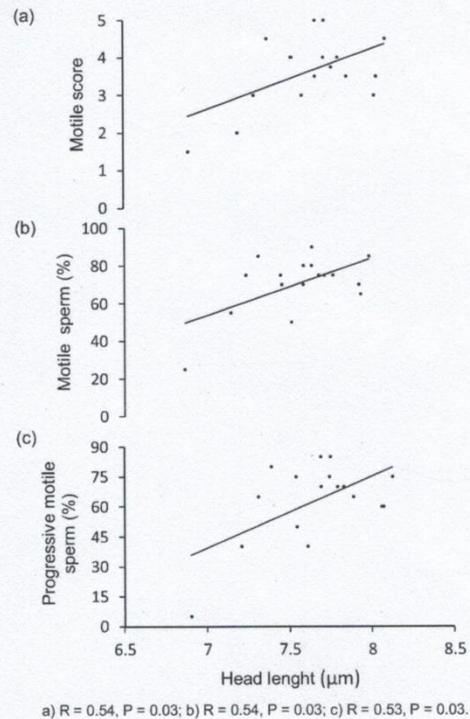


Fig. 1. Positive relationship between (a) motility score, (b) percentage of motile spermatozoa, and (c) percentage of spermatozoa with progressive motility and sperm head length of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*; n = 17 males).

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

Table 3
Morphometric descriptors of sperm head sub-population obtained with clusters analysis (mean \pm SEM) ($n = 1700$ sperm head).

Morphometric descriptors	Sperm sub-population		
	SP1	SP2	SP3
Length (μm)	8.19 \pm 0.03 ^a	7.77 \pm 0.01 ^b	7.24 \pm 0.02 ^c
Width (μm)	4.75 \pm 0.02 ^a	4.44 \pm 0.01 ^b	4.16 \pm 0.01 ^c
Area (μm^2)	32.41 \pm 0.09 ^a	28.86 \pm 0.04 ^b	25.16 \pm 0.06 ^c
Perimeter (μm)	24.07 \pm 0.09 ^a	22.25 \pm 0.03 ^b	20.52 \pm 0.04 ^c
Ellipticity	1.73 \pm 0.01	1.76 \pm 0.007	1.75 \pm 0.008
Rugosity	0.71 \pm 0.004 ^a	0.73 \pm 0.002 ^b	0.75 \pm 0.002 ^c
Elongation	0.26 \pm 0.003	0.27 \pm 0.002	0.27 \pm 0.002
Regularity	0.94 \pm 0.003	0.94 \pm 0.002	0.94 \pm 0.002
p2a	1.43 \pm 0.01 ^a	1.37 \pm 0.004 ^b	1.34 \pm 0.004 ^c
N	309	769	622

Shape value: p2a consider a minimum value of 1.0 for a circle.
Values with different superscripts (a, b, c) in the same row were different.
 $P < 0.001$.

among the sub-populations ($P < 0.001$), and ellipticity and elongation tended to differ ($P < 0.08$; Table 3). The three sub-populations were:

Sub-population 1 (SP1): characterized by sperm with the largest average head dimension and greatest value of p2a thus, this sub-population had sperm heads with less of a circular shape. This sub-population included $18.2 \pm 1.0\%$ of the sperm (range: 0–52%). Only one male had more than 50% of the total ejaculated sperm in the SP1 sub-population.

Sub-population 2 (SP2): contained the largest number of sperm, included $45.2 \pm 0.6\%$ (range: 4.0–70.0%) of the total sperm evaluated. This sub-population had intermediate values between SP1 and SP3. Seven of the 17 males evaluated (41.2%) had more than 50% of the sperm in the SP2 sub-population.

Sub-population 3 (SP3): included the sperm with the smallest head dimension, also the smallest value of p2a, so the shape of these sperm heads was the most similar to a circle. This sub-population corresponded to $36.6 \pm 1.1\%$ (range: 1–95%) of the total sperm. Four males had more than 50% of the sperm in the SP3 sub-population.

4. Discussion

The present research resulted in the first description of pampas deer sperm characteristics collected by electroejaculation during the breeding season. The spermogram pattern varied greatly among males and collections, so it is difficult to compare the results with preliminary data reported in this species (Duarte et al., 1993; Ungerfeld et al., 2008). This wide variation is probably related to the conditions under which sperm were obtained. Animals were likely stressed when being captured using anesthetic darts, maintained under general anesthesia and electroejaculated. This management has been previously reported to result in wide variability in sperm characteristics (Memon et al., 1986), and is highly stressful for the animals (Fumagalli et al., 2012). Considering that this is – at least until now – the only available technique to obtain sperm from the pampas deer species, the low concentration, volume, and overall quality obtained would probably be a limitation for cryopreservation.

The motility score and the overall motility were in the same range of those obtained in other deer species (de

Abreu et al., 2009; Gosch and Fischer, 1989). A large variability in the percentage of morphological abnormalities, head shape and size of the sperm from different males was found in the present study and likely occurs in other species (Giuliano et al., 2008). There was a large percentage of abnormal sperm, mainly distal and proximal droplets (residual cytoplasm) in the present study. This may be consequence of the process of sperm collection, as electrical stimuli may provoke the ejaculation of immature cells from the epididymis. Abnormalities have also been related in humans with elevated creatine kinase in sperm (Durutovic et al., 2013) an enzyme that increases serum concentration in pampas deer during the process of electroejaculation (Fumagalli et al., 2012). Large percentages of residual cytoplasm have been associated with decreased fertility rates in other species (Chandler et al., 1988; Keating et al., 1997). The excess of residual cytoplasm suggests that these sperm are still immature, and as a consequence could be dysfunctional (Keating et al., 1997). Similarly a large proportion of these abnormalities were also observed in other deer species (Drion et al., 2003) suggesting that this may be the general pattern for this cervid sperm variable. The large percentage of sperm cytoplasmic droplets (proximal and distal) and of tail abnormalities may explain the lesser motility observed in samples with a greater percentage of sperm viability. The flagellum is the most complex part of the sperm, composed of numerous structurally and functionally interdependent components. As sperm motility depends on the flagellum, defects in any component have negative effects on motility (Barth and Oko, 1989). Similar to what has been reported in bulls (Wells et al., 1970a,b), the large percentage of acrosome damage observed in the present study may be related to the long sexual rest of males allocated in single male groups. However, it should be considered that the population of the ECFA originated from fawns captured in the population located in Salto, one in 1981 and another group captured in 1982 for a total of 21 animals (8 males and 13 females) but five died (two males and three females) before reaching reproductive age, so homozygosity is a possible cause of poor quality semen (Baccetti et al., 2001). Captivity may also affect sperm quality (Morato et al., 2001) via the absence of natural selection for fertility (Araki et al., 2007). Overall, a specific cause for the poor sperm quality in the present study cannot be

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim. Reprod. Sci. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

ascertained. More studies are necessary to determine if the cause of the poor motility is consequence of animal management or if this lesser motility is reflective of what exists normally in pampas deer semen.

To the best of our knowledge this is the first report describing the morphometric descriptors of fresh ejaculated sperm in any deer species. Although there are some previous data on deer spermatozoa, those were measured from epididymal samples diluted with extenders (Esteso et al., 2009; Malo et al., 2006) or frozen–thawed sperm (Esteso et al., 2006). Indeed, it is important for future possible applications to include these data as part of the general characterization of pampas deer sperm. The head length was smaller and the width was similar to that obtained from sperm heads of *Dama dama* with electron microscopy (Gosch et al., 1989) and with CASA in *Cervus elaphus* (Esteso et al., 2009), as well as those reported in other ruminants (Gravance et al., 2009; Hidalgo et al., 2006; Maroto-Morales et al., 2010). Sperm variables have wide variations within mammals (Cummins and Woodall, 1985), and even within cervids (Drion et al., 2003), making it important to characterize these variables for each species instead of assuming the data from farm animals are reflective of those for deer species.

In the present study, there was a positive relationship between the morphometric descriptors and the motility score, overall motility and progressive motility of sperm. Similarly, Malo et al. (2006) and Ramón et al. (2013) found a positive relationship between head length and sperm velocity: those sperm with elongated heads swim faster, similar to previous findings of Gomendio and Roldan (1991). The results from the present study should be considered cautiously due to the low values obtained in those relationships. It is, nevertheless, interesting that values for morphometric descriptors obtained from the same males in two different collections in the present study were closely related. This information suggests that the head sperm size of pampas deer males is similar from one collection to the next for the same animal, and this pattern may persist during the life span of an individual pampas deer. If so, this information would be useful in choosing males for improved use of reproductive biotechnologies with this species. However, studies with more males assessing successive collections are necessary to confirm whether the findings of the present study are repeatable.

Vicente-Fiel et al. (2013) described the existence of sperm sub-populations in cattle, goats, sheep and pigs for individual males and among different males. Similar to what has been observed in other species (Esteso et al., 2009), in the present study three different sperm sub-populations (SP1: large sperm, SP2: intermediate sperm and SP3: small sperm) were present. The existence of sperm sub-populations reaffirms the idea that mammalian ejaculates are heterogeneous for sperm sub-populations that have different responses to biochemical (Buffone et al., 2004) or functional stimuli (Martínez-Pastor et al., 2005), motility patterns (Núñez-Martínez et al., 2006; Quintero-Moreno et al., 2003), and different morphometric descriptors (Peña et al., 2005; Thurston et al., 1999). Defining sperm sub-populations could be a practical tool to predict sperm cryo-resistance (Núñez-Martínez et al.,

2006; Quintero-Moreno et al., 2003). In other deer species (Esteso et al., 2006) the results after sperm cryopreservation are more desirable in males with a greater percentage of small sperm. Due to the small volume of semen which in some samples was no more than enough to evaluate fresh sperm, similar evaluations could not be performed in the present study. However, the existence of a large number of sperm heads in SP2 and SP3 sub-populations could be a reliable indicator of the cryo-resistance for pampas deer sperm. Further research using fresh and thawed sperm are needed to identify possible relationships between sperm head morphometric sub-populations and cryo-resistance in pampas deer.

5. Conclusion

The basic spermogram of pampas deer semen was characterized in the present study. The low concentration, small volume, poor overall quality, great incidence of abnormal morphology, and wide variation for these variables may be a limitation for the development of sperm cryopreservation banks for pampas deer. In addition, the morphometric descriptors of sperm heads were described with the existence of three sperm sub-populations that have different morphometric characteristics. Furthermore, results from the present study also demonstrate that the morphometric descriptors are maintained in different collections from the same males across time.

Conflict of interest statement

Authors have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the ECFA, Tabaré González-Sierra, Johnny Brioso, Ricardo Sorello, Edgardo Barrios for their help with animal management, and Solana González, Matías Villagrán, Alejandro Bielli, Cesar Savignone, Natalie Citon, Valentina Sitya, Pedro Claudino dos Santos, Olga García, Alejandro Maroto for help in the semen collections. This research was supported by CSIC (Universidad de la República) – Intendencia Departamental de Maldonado.

References

- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100–103.
- Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E., Piomboni, P., 2001. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum. Reprod.* 16, 1365–1371.
- Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press, pp. 285.
- Buffone, M.G., Doncel, G.F., Briggiler, C.I.M., Vazquez-Levin, M.H., Calamera, J.C., 2004. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum. Reprod.* 19, 139–146.
- Campbell, R.C., Dott, H.M., Glover, T.D., 1956. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.* 48, 1–8.
- Casey, P.J., Gravance, C.G., Davis, R.O., Chabot, D.D., Liu, I.K.M., 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallion. *Theriogenology* 47, 575–582.

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim. Reprod. Sci.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>

- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkinson, R.W., Memon, M.A., Hoyt, P.G., 1988. Semen quality characteristics of dairy goats. *J. Dairy Sci.* 71, 1638–1646.
- Cummins, J.M., Woodall, P.F., 1985. On mammalian sperm dimension. *J. Reprod. Fertil.* 75, 153–175.
- CITES, 2013. Appendices I, II and III, Valid from 12 June 2013. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>
- de Abreu, C., Martínez, A.C., de Moraes, W., Juvenales, J.C., Moreira, N., 2009. Características reprodutivas de veado-bororó-do-sul ou veado-mão-curta (*Mazama nana*). *Pesq. Vet. Bras.* 29, 993–998.
- Drion, P.V., Hanzen, C., Wirth, D., Beckers, J.F., Leboeuf, B., Ropstad, E., Balligand, M., Bauvir, E., Gabriela, A., Collin, B., 2003. Physiologie de la reproduction et endocrinologie chez les cervidés: une revue. *Ann. Méd. Vét.* 147, 291–313.
- Duarte, J.M.B., Arantes, I.G., Garcia, J.M., Nascimento, A.A., 1993. Captura e avaliação de uma população de *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* no Brasil. In: IUCN. Population and Viability Assessment for the Pampas Deer. SSC/IUCN.
- Durutovic, O., Lalic, N., Milenkovic-Petronic, D., Bojanic, N., Djordjevic, D., Milojevic, B., Ladjevic, N., Mimic, A., Tulic, L., Dzamic, Z., Micic, S., 2013. The correlation of biochemical and morphologic parameters in the assessment of sperm maturity. *Urology* 82, 1296–1299.
- Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Garde, J.J., 2003. Head dimension of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *CryoLetters* 24, 261–268.
- Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J., 2009. Identification of sperm head morphometric subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm samples. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 206–211.
- Esteso, M., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Quintero-Moreno, A., Garde, J.J., 2006. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 27, 662–670.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney.
- 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. *Zoo. Sci.* 30, 1110–1116.
- Fumagalli, F., Villagrán, M., Damián, J.P., Ungerfeld, R., 2012. Physiological and biochemical parameters in response to electroejaculation in adult and yearling anesthetized pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 308–312.
- Garde, J.J., Martínez-Pastor, F., Gomendio, M., Malo, A.F., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., García, A.J., Anel, L., Roldán, E.R.S., 2006. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 93–1002.
- Giuliano, S., Director, A., Gamberotta, M., Trasorras, V., Miragaya, M., 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci.* 104, 359–369.
- Gomendio, M., Roldán, E.R.S., 1991. Sperm competition influences sperm size in mammal. *Proc. R. Soc. Lond. B* 243, 181–185.
- González, S., Alvarez-Valín, F., Maldonado, J.E., 2002. Morphometric differentiation of endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with descriptions of new subspecies from Uruguay. *J. Mammal.* 83, 1127–1140.
- González, S., Cosse, M., Góss-Braga, F., Vila, A.R., Merino, M.L., Dellafiore, C., Cartes, J.L., Maffei, L., Gimenez-Dixon, M., 2010. Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758). In: Duarte, J.M.B., Gonzalez, S. (Eds.), *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Funep/IUCN, Jaboticabal, pp. 119–132.
- González, S., Maldonado, G., Leonard, J.A., Vilá, C., Barbanti-Duarte, J.M., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., Wayne, R.K., 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mol. Ecol.* 7, 47–56.
- Gosch, B., Bartolomeus, T., Fischer, K., 1989. Light and scanning electron microscopy of fallow deer (*Dama dama*) spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 87, 187–192.
- Gosch, B., Fischer, K., 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer *Dama dama* and their relationship to the antler cycle. *J. Reprod. Fertil.* 85, 7–17.
- Gravance, C.G., Casey, M.E., Casey, P.J., 2009. Pre-freeze bull sperm head morphometric related to post-thaw fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 81–88.
- Gravance, C.G., Liu, I.K., Davis, R.O., Hughes, J.P., Casey, P.J., 1996. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 108, 41–46.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the sperm class analyzer. *Theriogenology* 66, 996–1003.
- Holt, W.V., Pickard, A.R., 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.* 4, 143–150.
- IUCN, 2013. IUCN Red List of Threatened Species (<http://www.iucnredlist.org>). Downloaded on 24 February 2014.
- Jacobson, H.A., Bearden, H.J., Whitehouse, D.B., 1989. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J. Wildl. Manag.* 53, 224–227.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219–228.
- Keating, J., Grundy, C.E., Fivey, P.S., Elliott, M., Robinson, J., 1997. Investigation into the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 110, 71–77.
- Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., Roldán, E.R.S., 2006. Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246–249.
- Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Esteso, M.C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2010. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73, 437–448.
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Álvarez, M., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P., 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Bio. Reprod.* 72, 316–327.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology* 26, 823–827.
- Morato, R.G., Conforti, V.A., Azevedo, F.C., Jacomo, A.T.A., Silveira, L., Sana, D., Nunes, A.L.V., Guimaraes, M.A.B.V., Barnabe, R.C., 2001. Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction* 122, 745–751.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596–603.
- Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post-thaw quality. *J. Androl.* 26, 716–723.
- Pursel, V., Johnson, L., 1974. Cluteraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1, 63–68.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973–1990.
- Ramón, M., Soler, A.J., Ortiz, J.A., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Roldán, E.R.S., Garde, J.J., 2013. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biol. Reprod.* 89, 110–117.
- Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1996. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 24, 167–173.
- Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M.C., Núñez, J., Cucho, H., 2014. Ejaculate fractionation effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reprod. Dom. Anim.* 49, 71–78.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V., 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *J. Reprod. Fertil.* 117, 271–280.
- Ungerfeld, R., González-Pensado, S., Bielli, A., Villagrán, M., Olazabal, D., Pérez, W., 2008. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta Vet. Scand.* 50, 16.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Yáñez, J.L., 2013. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pig using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim. Reprod. Sci.* 139, 182–189.
- Wells, M.E., Wondafrash, T., Awa, O.A., Stephens, D.F., 1970a. Effect of sexual rest and subsequent regular collection on acrosome characteristics of bull spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 31, 67–71.
- Wells, M.E., Awa, O.A., Jay, L.G., Fancy, S.S., 1970b. Effect of sexual rest and frequency of ejaculation on sperm acrosomal morphology. *J. Dairy Sci.* 54, 526–530.

Please cite this article in press as: Beracochea, F., et al., Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim. Reprod. Sci.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.013>