

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN ENTRE LA EFECTIVIDAD DE LA CRIOPRESERVACIÓN
CLÁSICA Y LA VITRIFICACIÓN SEMINAL EN CHIVOS DURANTE LA
ESTACIÓN NO REPRODUCTIVA**

por

**Felipe ARISTEGUI IBARRA
Carlos MACHADO ESTEVES
Victoria URIOSTE ARRICAR**

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

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Danilo Fila

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Rodolfo Ungerfeld

Tercer miembro:

Dra. Daniela Crespi

Cuarto miembro:

Lic. Ma Noel Viera

Fecha:

Autores:

Felipe Aristegui Ibarra

Carlos Machado Esteves

Victoria Urioste Arricar

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por el apoyo incondicional durante toda la carrera, muchas gracias!

A nuestro tutor Rodolfo Ungerfeld por su orientación en el trabajo y sus aportes en la investigación.

A nuestra co-tutora Maria Noel Viera por la paciencia, dedicación, constancia y siempre buena disposición.

A Milton por la ayuda con los animales y cuidarlos tan bien.

A nuestros amigos de la vida por estar siempre y a nuestros compañeros de facultad, hoy nuestros amigos.

A todos muchísimas gracias!!

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESÚMEN.....	7
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Estacionalidad reproductiva.....	11
1.1.1 El fotoperíodo.....	11
1.2 Control endócrino de la reproducción en el macho.....	12
1.3 Criopreservación.....	13
1.3.1 Diluyentes.....	13
1.3.2 Congelación.....	13
1.3.3 Vitrificación.....	14
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	16
4. Materiales y métodos.....	17
4.1 Animales y su manejo.....	17
4.2 Evaluación de semen fresco.....	17
4.3 Adición del diluyente.....	17
4.4 Congelación y descongelación.....	18
4.5 Vitrificación y desvitrificación.....	18

4.6 Análisis estadístico.....	18
5. Resultados.....	19
5.1 Motilidad seminal.....	19
5.2 Móviles progresivos.....	20
5.3 Calidad seminal.....	22
5.4 Porcentaje de espermatozoides vivos.....	23
6. Discusión	26
7. Conclusión.....	29
8. Bibliografía.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1.A. Porcentaje de espermatozoides móviles de chivos adultos de Gabón a lo largo del tiempo.....	19
Figura 1.B. Porcentaje de espermatozoides móviles de chivos adultos de Gabón en función a las etapas.....	20
Figura 2.A. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de chivos adultos de Gabón a lo largo del tiempo.....	21
Figura 2.B. Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de chivos adultos de Gabón en función a las etapas.....	21
Figura 3.A. Calidad seminal de chivos adultos de Gabón a lo largo del tiempo.....	22
Figura 3.B. Calidad seminal de chivos adultos de Gabón en función a las etapas.....	23
Figura 4.A. Porcentaje de espermatozoides vivos en chivos adultos de Gabón a lo largo del tiempo.....	24
Figura 4.B. Porcentaje de espermatozoides vivos en chivos adultos de Gabón en función a las etapas.....	24

RESUMEN

La criopreservación de semen es muy utilizada para conservar el germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta técnica tiene ciertas ventajas como el transporte por largos períodos sin dañar el material, el almacenamiento por largo tiempo y la obtención de material genético de altísima calidad sin tener que comprar costosos reproductores. La técnica más utilizada es la congelación clásica con vapores de nitrógeno líquido, la cual está ampliamente distribuída y estudiada. En los últimos años también se ha desarrollado otra técnica para preservar el semen llamada vitrificación cinética y consiste en la disminución ultra rápida de la temperatura mediante la introducción de semen diluído directamente al nitrógeno líquido, en pequeños volúmenes. La vitrificación ofrece ventajas sobre la congelación tradicional, como ser la velocidad de la misma y su fácil realización por no necesitar materiales costosos. Sin embargo, es una técnica poco estudiada con semen de pequeños rumiantes, por lo que está en pleno desarrollo. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficacia de la técnica de criopreservación clásica con la de vitrificación cinética de semen de chivo de Gabón al final de la estación reproductiva y en la no reproductiva (desde mayo hasta octubre). Se colectó semen de 10 animales de manera quincenal mediante electroeyaculación. En semen fresco, se determinó la calidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva, también evaluamos el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, la concentración y la integridad de membrana. A partir de esto se realizó una columna de purificación. Luego el volumen de semen se dividió en dos alícuotas, agregando a una de ellas un diluyente de congelación (con glicerol) y a la otra un diluyente de vitrificación (con sucrosa). Posteriormente se realizaron las curvas de enfriado y se evaluaron los mismos parámetros que en semen fresco. Luego de la congelación y vitrificación, dichas muestras se descongelaron y desvitrificaron volviendo a evaluar los mismos parámetros antes mencionados. Estos datos fueron comparados mediante ANOVA para mediciones repetidas teniendo en cuenta como tratamientos la congelación y la vitrificación, determinando la influencia de la fecha de colección así como las diferentes etapas (0-semen fresco, 1- semen con diluyente de congelación/vitrificación y 2-descongelación/desvitrificación) y sus respectivas interacciones. En el estudio del semen, el porcentaje de espermatozoides móviles se preservó mejor mediante la congelación clásica que mediante la vitrificación cinética ($53,5 \pm 1,6$ vs $46,8 \pm 1,6$; $P=0,008$), demostrando diferencia significativa además de una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,001$). En el porcentaje de espermatozoides móviles en función de las etapas, se observó interacción del tratamiento en función a las mismas ($P=0,0001$), siendo la congelación un método más eficaz que la vitrificación en las etapas 1 y 2. A su vez, también existió interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$). Al evaluar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se observó que mediante la congelación los espermatozoides lograron preservarse mejor que con la vitrificación ($48,8 \pm 1,5$ vs $42,6 \pm 1,5$; $P=0,01$), demostrando diferencia significativa además de una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,001$). En el caso de la motilidad progresiva en función a las etapas existió

interacción del tratamiento en función a las mismas ($P=0.0001$), siendo la congelación mejor que la vitrificación. Existió también interacción triple entre el tratamiento, el tiempo y las etapas ($P=0,0001$). En el caso de la calidad seminal se observó que al igual que los demás parámetros ya mencionados, mediante congelación se obtuvieron mejores resultados que con la vitrificación ($2,2 \pm 0,1$ vs $1,9 \pm 0,1$; $P=0,05$), demostrando diferencia significativa además de una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,003$). En el caso de la calidad seminal en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento y las mismas ($P=0,0001$), obteniendo mejores resultados con la congelación. A su vez se observó interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$). La congelación clásica fue superior a la vitrificación cinética al evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra ($44,3 \pm 1,2$ vs $39,1 \pm 1,2$; $P= 0,007$), demostrando diferencia significativa además de una interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,008$). En el caso de los espermatozoides vivos en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento en función a las mismas ($P=0,0003$). También se observó interacción triple entre el tratamiento, el tiempo y las etapas ($P=0,0001$). Por último los espermatozoides normales no tuvieron efecto tratamiento ($121,9 \pm 6,3$ vs $124,0 \pm 6,1$; $P=0,48$), no se observó interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,23$) y tampoco entre el tratamiento en función a las etapas ($P=0,44$). El tratamiento, tiempo y las etapas presentaron interacción triple ($P=0,0001$). Se concluyó que la preservación del semen colectado de chivos de Gabón durante el final de la estación reproductiva y fuera de la misma fue más efectiva con la congelación clásica que con la vitrificación cinética.

SUMMARY

Semen cryopreservation is a widely used practice to preserve male germplasm indefinitely. This technique has certain advantages such as transportation for long periods without damaging the material, long-time storage and it allows obtaining genetic material of high quality without having to buy expensive breeders. The most commonly used technique is the classical freezing with liquid nitrogen vapors, which is widely distributed and studied; recently another technique has been developed to preserve semen which is called kinetic vitrification and consists of the ultra-rapid decrease of temperature by the introduction of diluted semen directly into liquid nitrogen in small volumes. Vitrification offers advantages over traditional freezing such as the higher speed and its easy accomplishment because it does not need expensive materials. However, this technique is less studied with small ruminants' semen, since it is still in development. The objective of this work was to compare the efficiency of the classical cryopreservation technique from the kinetic vitrification of goat semen from Gabon at the end of the reproductive season and at the non-reproductive season (from May to October). Semen was collected from 10 animals every 15 days by electroejaculation. In fresh semen, the quality, mass motility, percentage of motile spermatozoa and with progressive motility, the percentage of morphologically normal spermatozoa, the concentration and the membrane integrity were also evaluated. From this evaluation, a purification column was made. The volume of semen was then divided into two aliquots, adding to one of them a freezing diluent (with glycerol) and the other a diluent of vitrification (with sucrose). Afterwards, the cooling curves were performed and the same parameters were evaluated as in fresh semen. After freezing and vitrification, these samples were thawed and devitrified, re-evaluating the same parameters aforementioned. Their interaction was also evaluated. These data was compared through ANOVA for repeated measurements given as treatments the cooling and vitrification, determining the date collection influence as the different stages (0-fresh semen, 1- semen with freezing / vitrification diluent and 2- thawing / devitrification) and their respective interaction. In the semen study, motile spermatozoa was preserved better by classical freezing than by kinetic vitrification (53.5 ± 1.6 vs 46.8 ± 1.6 ; $P=0.008$), showing a significant difference in addition to an interaction between treatment and time ($P = 0.001$). In the motility in function of the stages, there was interaction between the treatment and the stages was observed ($P = 0.0001$), with freezing better than vitrification in stages 1 and 2. In turn, there was also a triple interaction between treatment time and stages ($P = 0.0001$). When evaluating progressive motility percentage, spermatozoa was better preserved by classical freezing than with vitrification (48.8 ± 1.5 vs 42.6 ± 1.5 ; $P=0.01$), showing a significant difference in addition to an interaction between Treatment and time ($P = 0.001$). In the case of progressive motility in function of the stages there was interaction between the treatment and stages ($P = 0.0001$), with classical freezing better than vitrification. There was also a triple interaction between treatment, time and stages ($P = 0.0001$). In seminal quality's case, it was observed that, as with the other parameters aforementioned, better results were obtained by freezing than with vitrification (2.2 ± 0.1

vs 1.9 ± 0.1 ; $P=0.05$), showing a significant difference in addition to an interaction between treatment and time ($P = 0.003$). When studying seminal quality in function of the stages, there was interaction between treatment and stages ($P = 0.0001$), with better results with classical freezing. At the same time, triple interaction between treatment time and stages was observed ($P = 0.0001$). Classical freezing was superior to kinetic vitrification when evaluating the percentage of spermatozoa with intact membrane (44.3 ± 1.2 vs 39.1 ± 1.2 ; $P= 0.007$), showing a significant difference in addition to an interaction between treatment and time ($P = 0.008$). In the case of living spermatozoa in function of the stages, there was interaction between treatment and stages ($P=0.0003$). There was also a triple interaction between treatment, time and stages ($P = 0.0001$). Finally, normal sperm had no treatment effect (121.9 ± 6.3 vs. 124.0 ± 6.1 ; $P=0.48$), no interaction between treatment and time ($P = 0.23$) and neither between treatment in function of the stages ($P=0.44$). Treatment, time and stages had triple interaction ($P = 0.0001$). It was concluded that the preservation of semen collected from Gabon goats during the end of the breeding season and not breeding season was more effective with classical freezing than with kinetic vitrification.

1. Introducción

El ganado caprino fue la primera especie productiva domesticada por el hombre antes del año 7000 aC, lo que llevó a su posterior distribución por todo el mundo. Actualmente hay muchas razas de cabras seleccionadas para la producción de leche, carne o pelo. La producción caprina ha aumentado en la última década alcanzando los 1000 millones de cabezas en el año 2014 (FAO, 2014). Este crecimiento se ve reflejado en los países del cono sur, donde la producción caprina es una alternativa interesante y en desarrollo dentro del área productiva. En nuestro país se estima que hay alrededor de 17400 caprinos (FAO, 2014), la mayor parte dedicada a la producción de leche, la que se emplea en la fabricación de yogures y quesos de varios tipos, siendo la carne un producto secundario (Ciappesoni, 2016).

1.1 Estacionalidad reproductiva

Las especies domésticas tienen diferentes patrones reproductivos, incluyendo especies que tienen reproducción estacional y especies con reproducción continua. En las especies con reproducción continua se presentan ciclos estrales repetidos sucesivamente durante todo el año (por ejemplo: vaca, cerda), mientras que en las estacionales, éstos se producen solamente durante un período del año (oveja, yegua, cabra) (Ungerfeld, 2011). La duración del período de actividad reproductiva, la libido y el comportamiento sexual y social son codificados por los factores genéticos y se modifican por la acción de los factores ambientales como el fotoperíodo, disponibilidad de alimento, temperatura, régimen pluvial y humedad. El periodo en que se presentan ciclos estrales en las hembras y actividad reproductiva intensa en los machos se denomina comúnmente como estación reproductiva (Giriboni, 2014). En especies con ésta característica se sincronizan los eventos reproductivos de forma que los partos ocurren en la época más ventajosa del año (Forsberg, 2011), de manera que dispongan de mayor cantidad y calidad de forraje (Bronson, 2009).

1.1.1. El fotoperíodo

El fotoperíodo es la principal señal ambiental que regula la actividad reproductiva en especies de reproducción estacional (Hafez, 1952). Este depende de la latitud, siendo más variable a lo largo del año en las regiones más alejadas del Ecuador. El Uruguay es un país de clima templado por lo que la estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes es más marcada que en zonas tropicales. En el caso de los machos se produce un aumento tanto de la actividad como del tamaño testicular y la espermatogénesis, alcanzando su máximo cuando el fotoperíodo es más corto (Santiago-Moreno et al., 2013).

El fotoperíodo requiere de tres componentes esenciales, un fotorreceptor para detectar la luz y un “reloj” para distinguir días cortos de días largos, una ruta neural para que comunique al sistema neuroendocrino y por último el sistema endocrino

involucrando la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias, el desarrollo gonadal y la retroalimentación gonadal producida por los esteroides sexuales (Bustos y Torres, 2012). La luz es percibida por la retina y transmitida por un complejo camino neural, que incluye el núcleo supraquiasmático y el ganglio cervical superior, hasta la glándula pineal donde el mensaje modula el ritmo de secreción de la hormona melatonina (Karsch et al., 1984), la que juega un papel fundamental en la regulación de la actividad hipotálamo-hipófiso-gonadal (Forsberg, 2011). Esta hormona se secreta en las horas de oscuridad (Bittman et al., 1983), por lo que el periodo de secreción es más prolongado cuando los días son cortos, lo que coincide con el momento en que se alcanza la mayor actividad sexual (Chemineau et al., 2008). Este aumento en la duración secretoria actúa como mensaje pasivo que brinda información al eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Oviedo y Camejo, 2001) estimulando o inhibiendo su actividad de acuerdo a la especie.

En pequeños rumiantes los centros hipotalámicos que regulan la actividad hipofisaria se estimulan al aumentar la cantidad de horas de secreción de melatonina, lo que lleva a un aumento en la secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) (Forsberg, 2011). Este aumento de concentración de estas hormonas en la época reproductiva (principalmente en otoño) (Karagiannidis et al., 2000) lleva a que los parámetros como volumen, concentración, motilidad (Kafi et al., 2004) y fertilidad del semen aumenten (Dacheux et al., 1981). Asimismo el porcentaje de espermatozoides muertos y anormales disminuye (Rahman y Kandil, 1984).

1.2 Control endocrino de la reproducción en el macho.

El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal es el principal encargado de regular la actividad reproductiva. En primer lugar, a nivel del hipotálamo, se secreta un neuropéptido que actúa sobre la hipófisis llamado hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Esta hormona es secretada de manera pulsátil, llegando a la adenohipófisis por el sistema porta hipofisario desencadenando así la liberación de la LH también de manera pulsátil y de FSH (Tilbrook y Clarke, 2001).

La FSH es la hormona que determina la actividad, el tamaño y la cantidad de células de Sertoli por lo que va a limitar la cantidad de espermatozoides producidos en la vida adulta, lo que es esencial para el inicio de la espermatogénesis (Giriboni, 2014). Estas células secretan las hormonas inhibina y activina y la proteína ligadora de andrógenos (ABP). Por otra parte, la LH llega a las células intersticiales del testículo llamadas células de Leydig, a través del torrente sanguíneo, estimulando la producción de testosterona (Stocco y McPhaul, 2006). Esta hormona es la más importante en la reproducción de los machos ya que es necesaria para la espermatogénesis y también para el transporte y maduración de los espermatozoides, y su eyaculación. A su vez, la masa muscular, la distribución del tejido graso y la actividad metabólica también dependen de la testosterona (Hedger y Hales, 2006).

1.3 Criopreservación

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado (Ribeiro-Peres et al., 2014). Existen distintas técnicas de criopreservación como la congelación y la vitrificación. Éstas, son de especial importancia ya que permiten conservar y almacenar caracteres genéticos de alta calidad por largos periodos de tiempo y largas distancias, evitando también el costoso traslado de los reproductores y disminuyendo así el riesgo sanitario. Esto es debido a que aumenta el tiempo de viabilidad del espermatozoide al reducir su tasa metabólica prolongando la supervivencia del semen mediante la disminución del porcentaje de sustratos empleados y la producción de toxinas. Uno de los principales problemas de estas técnicas es la disminución de la fertilidad del semen.

1.3.1 Diluyentes

Para criopreservar el semen es necesario el uso de diluyentes. Estos son un conjunto de sustancias o compuestos químicos que tienen como objetivo preservar la fertilidad del semen y viabilidad de los espermatozoide (Beracochea, 2014). Las funciones del mismo son aumentar el volumen del eyaculado, proteger contra efectos nocivos de enfriado rápido, proveer sustancias buffer contra cambios nocivos de pH, aportar sustancias como fuente de energía, busca mantener estables las presiones osmóticas y aporta elementos contra el crecimiento bacteriano. Además, los diluyentes tienen la capacidad de prevenir el shock térmico, son atóxicos, de fácil preparación y bajo costo. Los mismos se componen de agua bidestilada, sustancias buffer como TRIS (hidroximetil amino metano) y citrato de sodio para mantener el pH del medio, materiales orgánicos como yema de huevo para prevenir el shock térmico. Los huevos deben ser del día, se los lava con agua y jabón, se los sumerge 5 min en alcohol y se les saca la yema, la que se coloca en estufa a 65°C por 30 min. También se puede utilizar leche por la caseína, cuidando de inactivar la lactenina ya que es espermicida. Por ello se puede utilizar leche larga vida. También contiene azúcares como fuentes de energía, fundamentalmente fructosa o glucosa, inhibidores de crecimiento bacteriano como penicilina, estreptomycin y sustancias diversas como EDTA, ácido ascórbico.

1.3.2 Congelación

El método de congelación ha sido la técnica más antigua y que más ha influido en el empleo de la reproducción asistida. Los primeros trabajos han sido utilizados en la época del 50 en base al proceso utilizado en el bovino (Gibbons, 2002). La fertilidad obtenida en los programas de inseminación artificial en pequeños rumiantes es limitada, ya que la congelación y descongelación del semen ocasiona daños en una proporción significativa de los espermatozoides.

Además del estudio del método de inseminación, se han estudiado mucho los métodos de congelación y diluyentes a usar y aunque no se ha llegado a un consenso de con cuál se logran mejores resultados a la hora de descongelar, los más utilizados son diluyentes preparados a partir de Tris-yema de huevo y de lactosa-yema de huevo, teniendo este último mejores resultados a la hora de descongelar (45,8% de espermatozoides motiles contra 40,2% cuando se utiliza de tris-yema de huevo) (Brito et al, 2004). El semen caprino contiene una enzima proveniente de las glándulas bulbouretrales de tipo fosfolipasa A, coaguladora de la yema de huevo. Esta hidroliza la lecitina (compuesto de la yema de huevo) en ácidos grasos y lisolecitina, afectando la viabilidad espermática (Gibbons, 2002). La yema de huevo se coloca en estufa a 65 °C por 30 min para inactivar dicha enzima.

La capacidad fertilizante del semen disminuye durante la congelación lenta debido al daño provocado por cristales de hielo que se forman entre y dentro de las células. Este daño puede ser minimizado si la temperatura desciende lentamente. En ésta técnica se realiza una curva de enfriamiento lento con una primera etapa de equilibrio a 5°C durante 3 h, una segunda etapa de exposición a vapores de nitrógeno líquido a -80°C durante 10 min y finalmente se sumerge en dicho nitrógeno a -196°C (Santiago-Moreno, 2014). Esta disminución de la temperatura provoca un daño letal en algunos espermatozoides conocido como “shock térmico” provocando alteraciones morfológicas en la membrana plasmática (Aboagla et al, 2003). La viabilidad de los espermatozoides se ve afectada, tanto desde el punto de vista químico, como térmico y eléctrico cuando los procesos de congelación y descongelación no son los adecuados, por tanto disminuyendo la capacidad fértil del semen. Los espermatozoides sufren daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales (Leboeuf et al., 2000). Para evitar esto deben utilizarse crioprotectores para sacar el agua intracelular al exterior y así evitar que se congele durante el proceso de criopreservación (Gao y Crister, 2000). Deben utilizarse velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas, descendiendo la temperatura del semen de 30 a 5°C en un periodo de 1 a 4 h (Garde, 2002; Fiser y Fairfull, 1984). Por lo tanto, el éxito de la criopreservación del semen depende de la interacción entre el crioprotector, el tipo de diluyente, la tasa de enfriamiento y descongelación, el empaque y por último la variación individual del reproductor.

1.3.3 Vitrificación

La vitrificación es un método de criopreservación de semen que, a diferencia de la congelación clásica, se ha estudiado muy poco ya que su implementación ha sido muy reciente. Dicha técnica es muy utilizada en la preservación de embriones, en lo que se logran buenos resultados, pero no hay muchos avances en su uso en la preservación seminal de rumiantes.

La vitrificación es un método que permite la solidificación no solo de células sino también de toda la solución impidiendo la formación de cristales de hielo intracelulares

por la utilización de velocidades ultrarrápidas de enfriamiento en pequeños volúmenes de muestra (Bajo y Coroleu, 2009), y por lo tanto disminuir el daño celular (Bailey et al., 2000).

La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a cristalizar debido a un enorme incremento de la viscosidad (Fahy, 1986), manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación (Fahy et al., 1984). La solución vitrificante utilizada posee crioprotectores en alta concentración que al ser enfriados no cristalizan, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado, similar al vidrio, tomando de allí su nombre (Rall y Fahy, 1985).

Dicha técnica elimina totalmente la formación de cristales de hielo ya que al aumentar la velocidad de congelación disminuye los daños causados por el enfriamiento pasando rápidamente por el rango de temperatura de mayor peligro entre +15 a -5 °C (Dobrinsky, 1996; Martino et al, 1996; Isachenko et al, 1998).

La vitrificación tiene algunas ventajas en comparación con la congelación clásica, como el bajo costo, ya que no requiere materiales caros para su realización, la rapidez de la misma y su sencillez dado su reducido tiempo de exposición a bajas temperaturas. En cambio tiene como desventaja que requiere personal calificado para hacerlo correctamente, el shock osmótico por el uso de crioprotectores hipertónicos, efectos tóxicos por altas concentraciones de crioprotectores y también los cambios celulares relacionados a la exposición de bajas temperaturas. El shock osmótico es la exposición de las células a un medio extremadamente hipertónico, ocasionando que la membrana plasmática se rompa.

2. Hipótesis

La efectividad de la congelación clásica es mayor que la vitrificación cinética, pero de todas maneras es posible el uso de las dos técnicas. Esto puede deberse a que la vitrificación es una técnica aún en desarrollo y aun

Además, las características seminales y por tanto la respuesta a la criopreservación varía de acuerdo al momento del año.

3. Objetivo:

El objetivo del trabajo fue comparar la efectividad de la criopreservación clásica y de la vitrificación cinética en chivos de Gabón al final de la estación reproductiva y fuera de la misma (desde mayo hasta octubre).

4. Materiales y métodos

4.1. Animales y su manejo

El trabajo se realizó en las instalaciones del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria entre los meses de mayo y octubre de 2016, lo que va desde el fin de la estación reproductiva y la mayor parte de la no reproductiva (Giriboni, 2014). Se utilizaron 10 chivos de raza enana del Gabón (*Capra hircus*) adultos.

La colecta de semen se realizó quincenalmente mediante electroeyaculación utilizando una sonda rectal de 300 mm de largo x 9 mm de diámetro, con 3 electrodos longitudinales de cobre de 30 mm de longitud (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 en aumento desde 1 V hasta la eyaculación.

4.2. Evaluación de semen fresco

Enseguida de la colección del semen las muestras fueron evaluadas, manteniéndose en baño maría a 37°C durante todo el proceso de evaluación. Se evaluó la motilidad espermática a un aumento de 40X, y para ello se diluyeron 10 µL de semen en 500 µL de leche descremada UHT, colocándose sobre un portaobjetos y un cubreobjetos sobre la muestra. Se determinó la calidad, la cual se evalúa de acuerdo al porcentaje de motiles en la muestra, si tienen movimiento rectilíneo y el vigor de movimiento, asignando un valor de 0-5, siendo 0 cuando no hay movimiento y 5 cuando el movimiento es muy rápido. El porcentaje de espermatozoides mótiles y mótiles progresivos se observaron en microscopio con aumento a 40X. Para evaluar la integridad de la membrana se colocaron 10 µL de la muestra en una solución hipoosmótica (HOST) y se incubó durante 30 min a baño maría (a 37°C) que posteriormente se fijó en glutaraldehído al 2%. También se fijó una muestra en glutaraldehído para posteriormente evaluar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Luego, se realizó una columna de purificación con Bottom y Top (a partir de Bovipure y Bovidilute), lo que hace es generar un gradiente de densidad utilizado para separar y purificar los espermatozoides. Se colocó en la centrífuga a 300G por 20 min, que al finalizar se retiró y eliminó el sobrenadante y el plasma, los espermatozoides que quedan en el fondo son los mejores ya que tienen la capacidad de pasar la barrera osmótica. Posteriormente, en los espermatozoides purificados, se volvieron a evaluar los parámetros antes mencionados, a excepción del Host.

4.3. Adición del diluyente

En la muestra fijada en glutaraldehído se determinó la concentración de espermatozoides, colocándose 10 µl de semen en una cámara de Neubauer, utilizando

esta información para la dilución pre-congelación y pre-vitrificación. A dichas muestras se les agregó diluyente preparado previamente. Para esto utilizamos una base común de diluyente: tris, ácido cítrico, glucosa, estreptomycin, penicilina, agua destilada y 6% de yema de huevo. Para el caso de la congelación agregamos además glicerol y para el caso de la vitrificación agregamos sucrosa en lugar de glicerol (Santiago-Moreno, comunicación personal).

4.4 Congelación y descongelación

Luego de agregado el diluyente se volvió a evaluar la calidad, el porcentaje de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva. A dichas muestras se les disminuyó progresivamente la temperatura para evitar el cambio brusco (“Shock térmico”). Se colocaron en la heladera a 5 °C por 3 h para posteriormente colocarlo en pajuelas de 0,5 mL y luego 10 min en vapores de nitrógeno a -80°C para posteriormente colocarlo en nitrógeno líquido a -196°C. Al momento de la descongelación se quitaron las pajuelas del nitrógeno líquido manteniéndose durante 10 s a temperatura ambiente y posteriormente a 37°C por 30 s. Se secaron las pajuelas y se les cortaron los extremos, colocando el semen en un tubo eppendorf. Al momento de la descongelación se evaluó móviles, móviles progresivos, espermatozoides con membrana íntegra y espermatozoides normales (Santiago-Moreno, comunicación personal).

4.5. Vitrificación y desvitrificación

Una vez agregado el diluyente en las muestras, estas se colocaron en la heladera a 5 °C durante 30 min. Pasado ese tiempo se vitrificó en forma de pellets de 50 µL directamente sobre nitrógeno líquido. Para la desvitrificación se sacaron los criotubos del nitrógeno líquido a -196°C y se colocaron en el desvitrificador a una temperatura de entre 65 y 70°C. Este semen se colocó en un vaso de bohemia y ahí se analizaron los parámetros seminales de las muestras. Se evaluaron los mismos parámetros anteriormente mencionados en la evaluación de semen fresco (Santiago-Moreno, comunicación personal).

4.6 Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA para mediciones repetidas, considerando como factores principales el tratamiento (congelación y vitrificación), tiempo (días de colección de muestras), etapas (fresco, congelación/vitrificación y descongelación/desvitrificación) y sus respectivas interacciones.

5. RESULTADOS

5.1 Motilidad seminal

Al evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, éstos lograron preservarse mejor mediante la congelación clásica que con la vitrificación cinética ($53,5 \pm 1,6$ vs $46,8 \pm 1,6$; $P=0,008$), demostrando diferencia significativa. Además existió interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,001$). Esa diferencia se observó en los días 45 ($P=0,05$), 90 ($P=0,01$), 105 ($P=0,0001$), 150 ($P=0,0001$) y 165 ($P=0,02$) (Figura 1 A), siendo mayor para la congelación. En el caso de la motilidad en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento y las etapas ($P=0,0001$), la congelación fue mejor que la vitrificación en las etapas 1 y 2, demostrando diferencia significativa $P=0,001$ y $P=0,0004$ respectivamente (Figura 1B). Existe también interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$).

A)

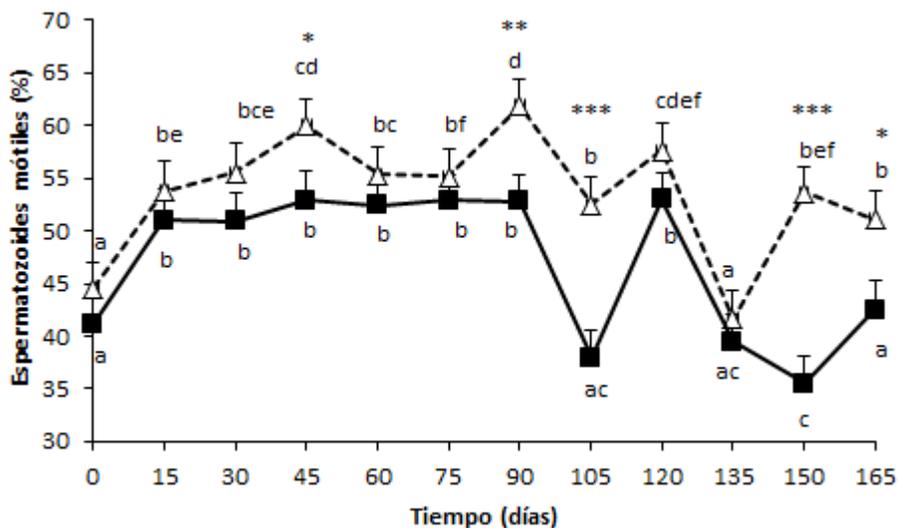


Figura 1 A: Porcentaje de espermatozoides móviles en semen de chivos adultos de Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de los días de colección.

B)

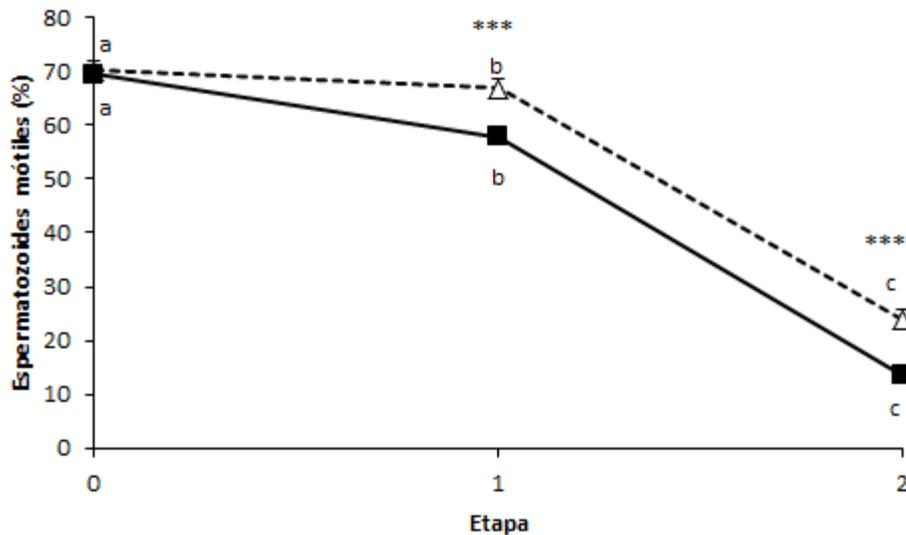


Figura 1 B: Porcentaje de espermatozoides móviles en semen de chivos adultos de Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de las etapas (0: semen fresco, 1: semen con diluyente y 2: descongelación/ desvitrificación) (1 B). Se evaluó para los dos tratamientos; congelación (-Δ-) y vitrificación (-■-). Las diferentes letras indican diferencias significativas en un mismo tratamiento. Existen también diferencias significativas entre los tratamientos en una misma etapa o tiempo como: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$) y ***($P < 0,001$).

5.2 Móviles progresivos

Al evaluar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, éstos lograron preservarse mejor mediante la congelación clásica que con la vitrificación cinética ($48,8 \pm 1,5$ vs $42,6 \pm 1,5$; $P=0,01$), mostrando diferencia significativa. Además existió interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,001$). Esa diferencia se observó en los días 45 ($P=0,05$), 90 ($P=0,01$), 105 ($P=0,0002$), 150 ($P=0,0001$) y 165 ($P=0,01$) (figura 2A), siendo mayor para la congelación. En el caso de la motilidad progresiva en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento y las mismas ($P=0,0001$), siendo la congelación mejor que la vitrificación en las etapas 1 y 2, demostrando diferencia significativa $P=0,0006$ y $P=0,001$ respectivamente (Figura 2B). Existe también interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$).

A)

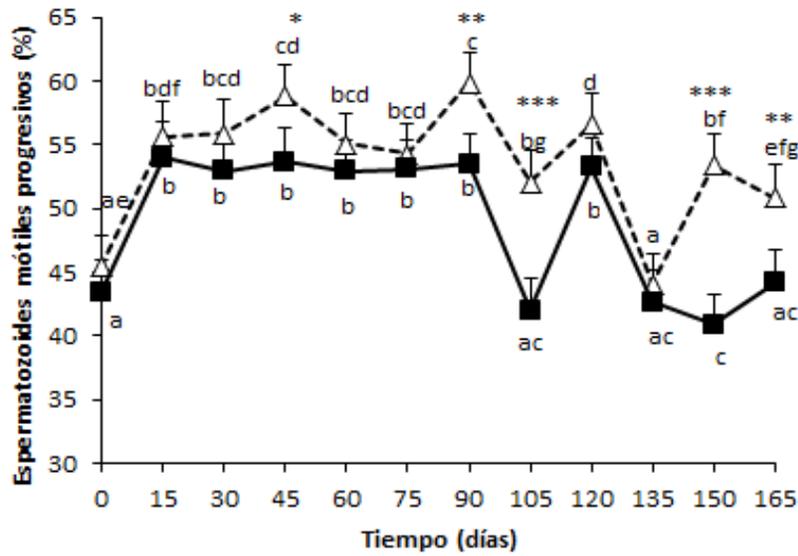


Figura 2 A: Porcentaje de semen con motilidad progresiva de chivos adultos de Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de los días de colección.

B)

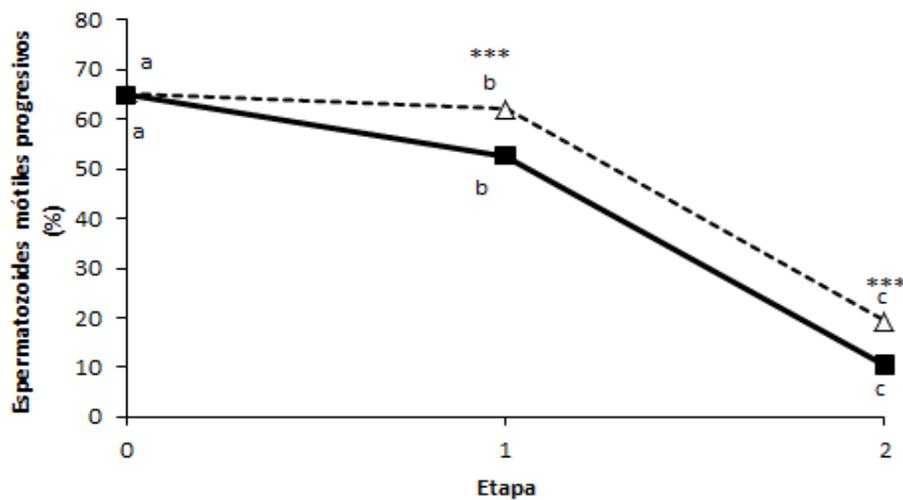


Figura 2 B: Porcentaje de semen con motilidad progresiva de chivos adultos de Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de las etapas (0: semen fresco, 1: semen con diluyente y 2: descongelación/ desvitrificación) (2 B). Se evaluó para los dos tratamientos; congelación (-Δ-) y vitrificación (-■-). Las diferentes letras indican diferencias significativas en un mismo tratamiento. Existen también diferencias significativas entre los tratamientos en una misma etapa o tiempo como: * (P<0,05), ** (P<0,01) y *** (P<0,001).

5.3 Calidad seminal

Al evaluar la calidad seminal mediante la congelación clásica se obtuvieron mejores resultados que con la vitrificación cinética ($2,2 \pm 0,1$ vs $1,9 \pm 0,1$; $P=0,05$), demostrando una diferencia significativa. Además existió interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,003$). La diferencia significativa se observó en los días 150 y 165 ($P=0,001$) (Figura 3 A), siendo mayor para la congelación. En el caso de la calidad seminal en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento y las mismas ($P=0,0001$), siendo la congelación mejor que la vitrificación en las etapas 1 y 2 demostrando diferencia significativa $P=0,02$ y $P=0,002$ respectivamente (Figura 3B). Existe también interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$).

A)

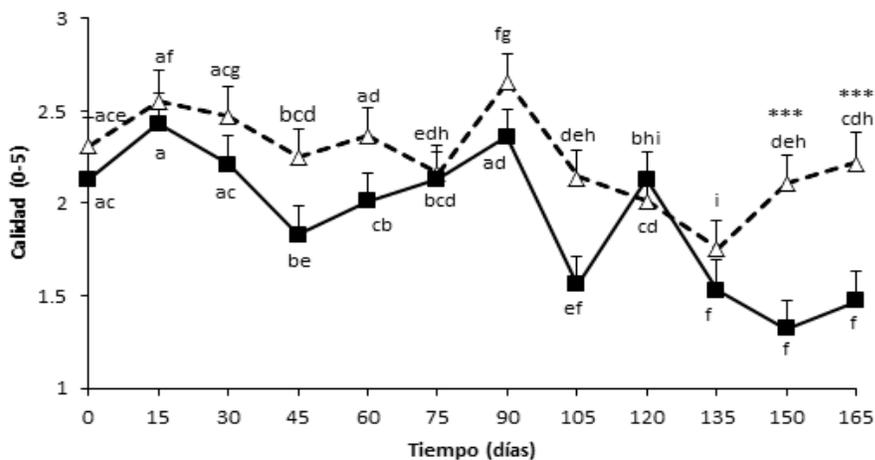


Figura 3 A: Calidad seminal de chivos adultos de Gabón durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de los días de colección.

B)

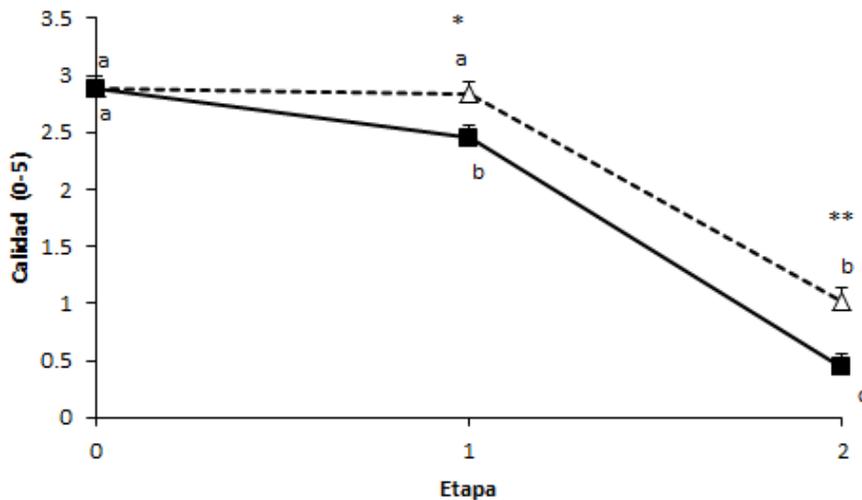


Figura 3 B: Calidad seminal de chivos adultos de Gabón durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de las etapas (0: semen fresco, 1: semen con diluyente y 2: descongelación/ desvitrificación) (3 B). Se evaluó para los dos tratamientos; congelación (-Δ-) y vitrificación (-■-). Las diferentes letras indican diferencias significativas en un mismo tratamiento. Existen también diferencias significativas entre los tratamientos en una misma etapa o tiempo como: *($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

5.4 Porcentaje de espermatozoides vivos

La congelación clásica fue superior a la vitrificación cinética al evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos ($44,3 \pm 1,2$ vs $39,1 \pm 1,2$; $P=0,007$), mostrando diferencia significativa. Además existió interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,008$). Esa diferencia se observó en los días 0 ($P=0,01$), 105 ($P=0,03$) y 150 ($P=0,0001$) (Figura 4 A), siendo mayor para la congelación. En el caso del porcentaje de espermatozoides vivos en función a las etapas existió interacción entre el tratamiento y las mismas ($P=0,0003$). La congelación fue mejor que la vitrificación en las etapas 1 ($P= 0,0001$) y 2 ($P=0,01$) (Figura 4B). Existe también interacción triple entre el tratamiento el tiempo y las etapas ($P=0,0001$).

A)

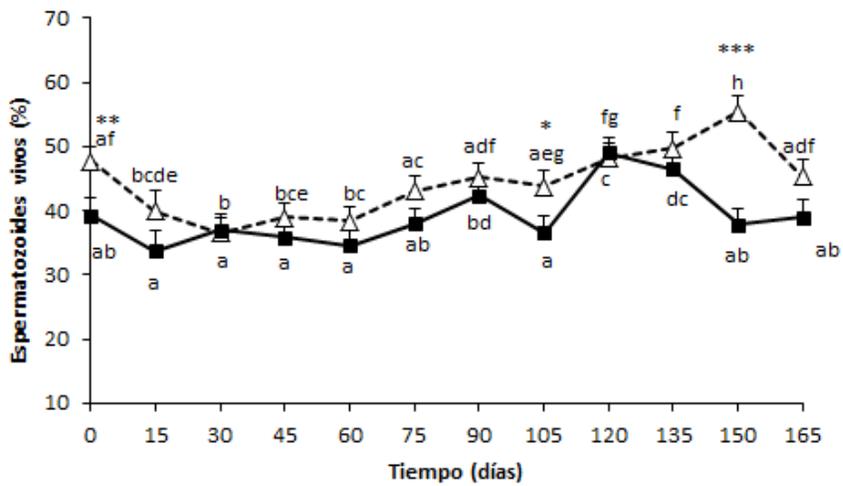


Figura 4 A: Porcentaje de espermatozoides vivos en semen de chivos de adultos Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de los días de colección

B)

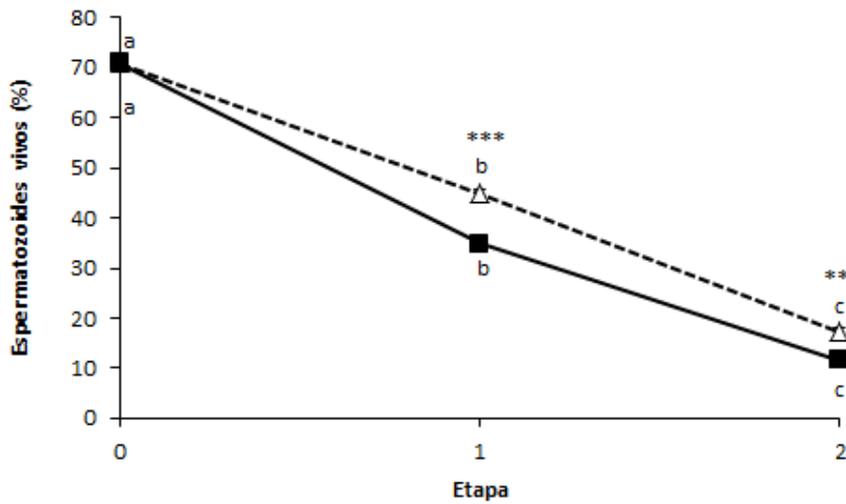


Figura 4 B: Porcentaje de espermatozoides vivos en semen de chivos de adultos Gabón, durante la estación reproductiva y no reproductiva a lo largo de las etapas (0: semen fresco, 1: semen con diluyente y 2: descongelación/ desvitrificación) (4 B). Se evaluó para los dos tratamientos; congelación (-Δ-) y vitrificación (-■-). Las diferentes letras indican diferencias significativas en un mismo tratamiento. Existen también diferencias significativas entre los tratamientos en una misma etapa o tiempo como: *(P<0,05), ** (P<0,01) y *** (P<0,001).

Al evaluar los el porcentaje de espermatozoides normales, no hubo efecto tratamiento ($121,9 \pm 6,3$ vs $124,0 \pm 6,1$; $P=0,48$). No existió interacción entre el tratamiento y el tiempo ($P=0,23$). En el caso del porcentaje de espermatozoides normales en función a las etapas, tampoco existió interacción entre el tratamiento y las etapas ($P=0,44$). El tratamiento, tiempo y las etapas presentaron interacción triple ($P=0,0001$).

6. Discusión

La técnica de congelación clásica permitió obtener mejores resultados que la de vitrificación cinética. Esto puede ser parcialmente explicado por el uso de crioprotectores de bajo peso molecular y permeables como el glicerol en la congelación, lo que permite reemplazar el agua intracelular y minimizar la formación de cristales dentro de la misma a velocidades de enfriamiento óptimas (3 h) evitando así el “Shock térmico”; que es la respuesta del espermatozoide ante un cambio brusco de temperatura (Palma, 2001). En cambio en la vitrificación se utilizan crioprotectores de alto peso molecular pero no permeables como la sucrosa, que no ingresan dentro de la célula como en el método anterior sino que la deshidratan desde afuera (Celestinos y Gatica, 2002). La principal diferencia que tiene la vitrificación con la congelación clásica es que en este último la concentración de crioprotectores es menor y el descenso de temperatura es más lento y controlado (Celestinos y Gatica, 2002), por lo que el daño celular en la congelación clásica es menor. Por otro lado, la vitrificación tiene efectos tóxicos por altas concentraciones de crioprotectores y también los cambios celulares relacionados a la exposición de bajas temperaturas.

Al evaluar el semen, los resultados obtenidos en el caso de la motilidad de los espermatozoides en la congelación fueron superiores a los obtenidos con la vitrificación. Esto difiere de lo reportado por Martínez et al (2016), quienes reportaron que la motilidad del semen humano vitrificado fue mejor que el de el semen procesado por congelamiento lento. Estos autores reportaron que la vitrificación provoca menor daño al ADN espermático, y por lo tanto a su motilidad. Esta diferencia en los resultados entre el semen de chivos y el de los humanos puede vincularse con la estacionalidad, ya que mientras que los humanos tienen la capacidad de reproducirse todo el año, los chivos de Gabón presentan reproducción estacional, realizando las colecciones de semen principalmente fuera de la etapa reproductiva (Mayo-Octubre) (Giriboni, 2014) donde hay menor concentración de hormonas FSH y LH, lo que lleva a una disminución en la calidad seminal, demostrado por una disminución en los parámetros como volumen, mótilos, mótilos progresivos, normales y concentración (Karagiannidis et al., 2000). Esta disminución en la calidad espermática, lleva a que estos sean más sensibles a los procesos de congelación y descongelación. La diferencia observada a favor de la congelación clásica se explica por la curva de enfriamiento lenta, que es menos agresiva para los espermatozoides, mientras que en la vitrificación cinética el cambio brusco de temperatura lleva a un aumento de los espermatozoides no viables.

El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue menor a la reportada por Ruiz et al (2010) que realizó un trabajo con semen ovino, utilizando el glicerol y etilenglicol como crioprotectores. En el caso de los espermatozoides vivos

sucede lo mismo, ya que la media fue menor a la que se obtuvo en el trabajo de López (2014) utilizando glicerol como crioprotector. La diferencia puede estar dada por el método de colección del semen, ya que en esos trabajos se colectó con vagina artificial, lo que imita a una vagina natural, logrando estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación, dando eyaculados con alta motilidad y concentración (Cueto et al., 2011), mientras que la utilización de la electroeyaculación presenta una serie de inconvenientes, tales como, menor resistencia al choque térmico y a los procesos de congelación y descongelación y contaminación por orina (Garde, 2002) aunque ésta última no sucedió en nuestro caso.

Luego de la criopreservación, la sobrevivencia de los espermatozoides es dependiente de la tasa de congelación, descongelación y especialmente la temperatura a la que los espermatozoides son enfriadas antes de la introducción al nitrógeno líquido, lo que es conocido como “temperatura intermedia de sumergimiento sub-cero” (Medina et al., 2007). El porcentaje de espermatozoides vivos fue de aproximadamente 70% en ambas técnicas de criopreservación utilizadas. Al agregar el diluyente se vio una clara disminución de espermatozoides vivos que fue aún mayor al observar el porcentaje de vivos luego de la descongelación/desvitrificación. En este proceso los espermatozoides se encuentran frente a una acción perjudicial por lo que los resultados de los parámetros evaluados disminuyen aún más (Bernardi, et al., 2011). Esta disminución de la vitalidad se corresponde con la obtenida en el trabajo de Escudero (2015), en el que se compararon tres diluyentes comerciales para las técnicas de congelación clásica y vitrificación, obteniendo como mejor resultado la criopreservación con Triladyil, llegando a un porcentaje de espermatozoides vivos de 97, 60% para la congelación clásica y 59,50% para la vitrificación pre congelación; disminuyendo a 59,50% para la primera y 3,5% para la segunda técnica a los 45 días de criopreservado el semen (Escudero, 2015). El diluyente utilizado en dicho trabajo tiene componentes similares al utilizado en nuestro trabajo. Se pueden observar algunas diferencias entre el semen de chivo y el de ovinos que es una especie que presenta diferencias en el eyaculado tales como el color, el volumen y la concentración de espermatozoides (Alape et al., 2011). Una diferencia muy importante es la fosfolipasa A, una enzima presente en el semen del macho cabrío, que es secretada por las glándulas bulbouretrales y es un componente importante del plasma seminal. Es una enzima coaguladora de la yema de huevo que actúa sobre las lecitinas transformándolas en lisolectinas y ácidos grasos, además produce efecto espermicida (Gibbons, 2002). La concentración de la Fosfolipasa A varía de acuerdo a cada macho cabrío siendo más alta cuando el semen se obtiene mediante electroeyaculación (Alape et al., 2011). Una manera de disminuir dicha enzima es quitando plasma seminal mediante centrifugación de semen (Cortes, 2006). La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes es influenciada por factores ambientales, afectando el peso y tamaño testicular,

producción de espermatozoides y fertilidad (Alape et al., 2011). Las glándulas bulbouretrales, responsables por la secreción de fosfolipasa A, también tiene influencia estacional, así como las vesículas seminales, que en período reproductivo sus secreciones son capaces de inactivar la fosfolipasa A (Alape et al., 2011).

La calidad espermática disminuyó una vez descongelado el semen. Esta reducción ha sido ampliamente descrita también en equinos (Salazar et al., 2011), y en el trabajo de Restrepo et al (2014), quienes observaron una disminución de la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana.

En general, mediante la congelación clásica se obtuvieron mejores resultados que con la vitrificación cinética; posiblemente, los parámetros seminales tanto de congelación como los de vitrificación, se puedan incrementar al realizar el mismo trabajo en la etapa reproductiva (fin de la primavera hasta mediados de otoño) (Giriboni, 2014). En ésta época es cuando hay máxima actividad sexual, mayor producción de semen y los parámetros del mismo mejoran (Cueto et al., 2000).

7. Conclusión

La preservación del semen colectado de chivos de Gabón durante el final de la estación reproductiva y fuera de la misma fue más efectiva con la congelación que con la vitrificación.

8. Bibliografía

1. Aboagla, E., Eiman, E., Terada, T. (2003). Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing. *Biology of Reproduction*, 69: 1245-1250.
2. Alape, I., Hurtado, M., Jerez, K. (2011). Semen Bovino, Ovino y Caprino. Disponible en: <https://prezi.com/7gtj8cjvsy83/semen-bovino-ovino-caprino/>. Fecha de consulta: 7/3/2017.
3. Bailey, J., Bilodeau, J-F., Cormier, N. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, 21:1-7.
4. Bajo, J.M., Coroleu, B. (2009). *Fundamentos de Reproducción*. Madrid. Médica Panamericana, 408 p.
5. Beracochea, M.F. (2014). Caracterización y criopreservación de semen en venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Tesis Facultad de Veterinaria, Udelar, 78 p.
6. Bernardi, S.F., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, G., Marini, P.R., (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet*, 13:25-38.
7. Bittman, E. L., Karsch F. J., Hopkins, J. W. (1983). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 113: 329-336.

8. Brito, F., Valencia, M., Balcázar, S., Angulo, M., Mejía, V. (2004). Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8: 28-37.
9. Bronson, F. H. (2009). Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 364: 331-334.
10. Bustos Obregon, E., Torres, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30:1266-1279.
11. Celestinos, M., Gatica, R. (2002) Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34: 157-165.
12. Chemineau, P., Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., del Campo, A., Malpoux, B., Tortonese, D., González-Bulnes, A., López-Sebastián, A. (2008). Endogenous circannual cycles of ovarian activity and changes in prolactin and melatonin secretion in wild and domestic female sheep maintained under a long day photoperiod. *Biology of Reproduction*, 78:552-562.
13. Ciappesoni (2016). La producción caprina en Uruguay y Latinoamérica. Disponible en: <http://www.capraispana.com/la-produccion-caprina-en-uruguay-y-latinoamerica/#Uruguay>. Fecha de consulta: 17/1/2017.
14. Cortes, S. (2006). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis Universidad Complutense de Madrid, España, total de páginas: 130 p.
15. Cueto, M., Gibbons, A., Abad, M. (2000). Reproducción en caprinos. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/56-reproduccion.pdf. Fecha de consulta: 6/3/2017.

16. Cueto, M., Gibbons, A., Garcia, J., Arrigo, J., Wolff, M. (2011). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Reproducción y Genética, INTA Bariloche. 14p.
17. Dacheux, J.L., Pisselet, C., Blanc, M.R., Hochereau-de-Reviere, M.T., Courrot, M. (1981). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 363-371.
18. Dobrinsky, J. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45: 17-26.
19. Escudero, J. (2015). Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales. Trabajo de Titulación. Facultad de ciencias pecuarias. Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador, 68 p.
20. Fahy, G., MacFarlane, D., Angell, C., Meryman, C. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21:407-426.
21. Fahy, G. (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13.
22. FAO (2014). Ganadería. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QA>. Fecha de consulta: 17/1/2017.
23. Fiser, P., Fairfull, R. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21: 542-551.
24. Forsberg, M. (2011). Estacionalidad reproductiva: el significado de la luz. En: Ungerfeld, R (2011). *Reproducción en los Animales Domésticos*. Montevideo, Melibea, V 1, p. 123-149.

25. Gao, D., Critser, J.K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR Journal*, 41:187-196.
26. Garde, J. (2002). Congelación de semen de la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Universidad Complutense de Madrid, 158 p.
27. Gibbons, A. (2002). Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza angora. *Taurus*, 16: 24-32.
28. Giriboni, J. (2014). Estímulo con hembras en celo y estacionalidad reproductiva de chivos adultos del Gabón. Tesis Facultad de Ciencias, Udelar, 76 p.
29. Hafez, (1952). Endocrinología de la actividad reproductiva en pequeños rumiantes. Disponible en: [https://www.google.com.uy/webhp?sourceid=chrome-instant&rlz=1C1AVNE_enUY698UY699&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Hafez,+1952+fotoperiodo&*](https://www.google.com.uy/webhp?sourceid=chrome-instant&rlz=1C1AVNE_enUY698UY699&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=Hafez,+1952+fotoperiodo&*.). Fecha de consulta: 10/2/2017.
30. Hedger, M.P., Hales, D.B. (2006). The Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. En: Neill, J. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. London, Elsevier, p. 1195-1286.
31. Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F., Grishchenko, V. (1998). Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant. *Cryobiology*, 36: 250-253.
32. Kafi, M., Safdarian, M., Hashemi, M. (2004). Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*, 53: 133-139.

33. Karagiannidis, A., Varsakelib, S., Alexopoulosa, C., Amarantidisa, I. (2000). Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*. 37:125-130.
34. Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., Robinson, J. E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research*, 40: 185-232.
35. Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62:113-141.
36. López, J. (2014). Criopreservación de semen. Disponible en: <http://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/criopreservacion-de-semen/> . Fecha de consulta: 20/2/2017
37. Martínez, G., N., Riva, N., López, C.A., Laizzo, R.S., Artola, M., Ruhlmann, C. (2016). Análisis comparativo del congelamiento lento y la vitrificación para la criopreservación de espermatozoides. *Reproducción*. 31: 7-14.
38. Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S. (1996). Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. *Biology of Reproduction*, 54: 1059-1069.
39. Medina, V.M., Sánchez, E., Velasco, Y.M., Cruz, P.E, (2007). Crioconservación de semen bovino usando congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad post descongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia* 11: 75-86.
40. Oviedo, N.J., Camejo, M.I. (2001). La Melatonina, posible agente terapéutico?. *Interciencia* 26: 103-107

41. Palma, G. (2001). Biotecnología de la reproducción. Balcarce, Reprobiotec, 695 p.
42. Rahman, H. A., Kandil, A. H. A. (1984). Seasonal variation in mating behavior of male goats in association with some semen characteristics. *Minufiya Journal of Agricultural Research*, 9: 257-270.
43. Rall, W., Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
44. Restrepo, G., Usuaga, A., Montoya, J., Celis, A., Henao, A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación*, 11:63-70.
45. Ribeiro-Peres, A., Munita- Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M.I., Ferreira de Souza, F. (2014). Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46: 31-38.
46. Ruiz, J., Correa, JE., Martínez, M. (2010). Vitricación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42: 79-83.
47. Salazar, J., Teague, S., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T., Varner, D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* 76: 409-418.
48. Santiago-Moreno, J. (2014). Influencia del estatus endocrino en la respuesta a la congelación y vitricación de espermatozoides de pequeños rumiantes: uso de rumiantes silvestres y doméstico como modelo experimental. *Memoria Científica, Facultad de Veterinaria, Udelar*, 20 p.

49. Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Coloma, M.A., Estesó, M.C., Prieto, M.T., Delgadillo, J.A., López-Sebastián., A. (2013). Photoperiod and melatonin treatment for controlling sperm parameters, testicular and accessory sex glands size in male Iberian ibex: a model for captive mountain ruminants. *Animal Reproduction Science*, 139: 45-52.
50. Stocco, D.M., McPhaul, M. J. (2006). Physiology of testicular steroidogenesis. En: Neill, JD. Knobil and Neill´s *Physiology of Reproduction*. 3a ed. Missouri, Elsevier, V1, p. 977-1016.
51. Tilbrook, A.J., Clarke, I.J. (2001). Negative Feedback Regulation of the Secretion and Actions of Gonadotropin-Releasing Hormone in Males. *Biology of Reproduction*, 49: 779-788.
52. Ungerfeld, R. (2011). *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo. Melibea, V 1, 584 p.